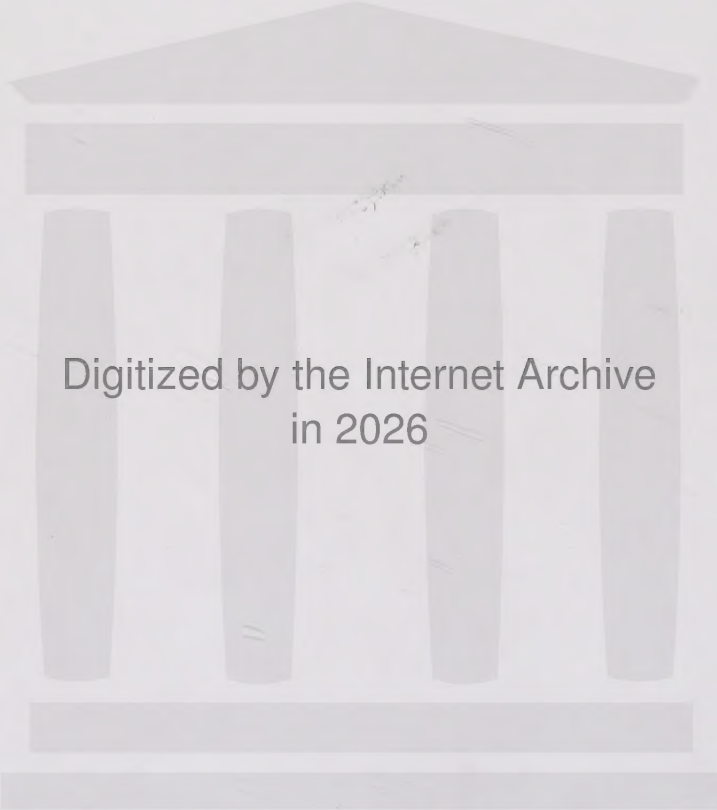


CHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
DER LEBERDROGEN BUTEA MONOSPERMA (LAM.) TAUB.,
ECLIPTA ALBA (L.) HASSK., WEDELIA CALENDULACEA LESS.,
LOPHOPHYTUM LEANDRI EICHL. UND
EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS

BETTINA GEYER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0016

Chemische und pharmakologische Untersuchungen
der Leberdrogen Butea monosperma (Lam.) Taub.,
Eclipta alba (L.) Hassk., Wedelia calendulacea Less.,
Lophophytum leandri Eichl. und
Eichhornia crassipes (Mart.) Solms

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Bettina Geyer
aus
Baldham b. München

Mai 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. R e i m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 1986

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Einleitung

2.2. Zielsetzung und Aufgabenstellung

2.3.1. Zielsetzung	1
2.3.2. Aufgabenstellung	2
2.4.1. Zielsetzung	3
2.4.2. Aufgabenstellung	4
2.5.1. Zielsetzung	5
2.5.2. Aufgabenstellung	6
2.6.1. Zielsetzung	7
2.6.2. Aufgabenstellung	8
2.7.1. Zielsetzung	9
2.7.2. Aufgabenstellung	10

2.8.1. Zielsetzung

2.8.2. Aufgabenstellung	11
2.9.1. Zielsetzung	12
2.9.2. Aufgabenstellung	13
2.10.1. Zielsetzung	14
2.10.2. Aufgabenstellung	15
2.11.1. Zielsetzung	16
2.11.2. Aufgabenstellung	17
2.12.1. Zielsetzung	18
2.12.2. Aufgabenstellung	19
2.13.1. Zielsetzung	20
2.13.2. Aufgabenstellung	21
2.14.1. Zielsetzung	22
2.14.2. Aufgabenstellung	23
2.15.1. Zielsetzung	24
2.15.2. Aufgabenstellung	25
2.16.1. Zielsetzung	26
2.16.2. Aufgabenstellung	27
2.17.1. Zielsetzung	28
2.17.2. Aufgabenstellung	29
2.18.1. Zielsetzung	30
2.18.2. Aufgabenstellung	31
2.19.1. Zielsetzung	32
2.19.2. Aufgabenstellung	33
2.20.1. Zielsetzung	34
2.20.2. Aufgabenstellung	35
2.21.1. Zielsetzung	36
2.21.2. Aufgabenstellung	37
2.22.1. Zielsetzung	38
2.22.2. Aufgabenstellung	39
2.23.1. Zielsetzung	40
2.23.2. Aufgabenstellung	41
2.24.1. Zielsetzung	42
2.24.2. Aufgabenstellung	43
2.25.1. Zielsetzung	44
2.25.2. Aufgabenstellung	45
2.26.1. Zielsetzung	46
2.26.2. Aufgabenstellung	47
2.27.1. Zielsetzung	48
2.27.2. Aufgabenstellung	49
2.28.1. Zielsetzung	50
2.28.2. Aufgabenstellung	51
2.29.1. Zielsetzung	52
2.29.2. Aufgabenstellung	53
2.30.1. Zielsetzung	54
2.30.2. Aufgabenstellung	55
2.31.1. Zielsetzung	56
2.31.2. Aufgabenstellung	57
2.32.1. Zielsetzung	58
2.32.2. Aufgabenstellung	59
2.33.1. Zielsetzung	60
2.33.2. Aufgabenstellung	61
2.34.1. Zielsetzung	62
2.34.2. Aufgabenstellung	63
2.35.1. Zielsetzung	64
2.35.2. Aufgabenstellung	65
2.36.1. Zielsetzung	66
2.36.2. Aufgabenstellung	67
2.37.1. Zielsetzung	68
2.37.2. Aufgabenstellung	69
2.38.1. Zielsetzung	70
2.38.2. Aufgabenstellung	71
2.39.1. Zielsetzung	72
2.39.2. Aufgabenstellung	73
2.40.1. Zielsetzung	74
2.40.2. Aufgabenstellung	75
2.41.1. Zielsetzung	76
2.41.2. Aufgabenstellung	77
2.42.1. Zielsetzung	78
2.42.2. Aufgabenstellung	79
2.43.1. Zielsetzung	80
2.43.2. Aufgabenstellung	81
2.44.1. Zielsetzung	82
2.44.2. Aufgabenstellung	83
2.45.1. Zielsetzung	84
2.45.2. Aufgabenstellung	85
2.46.1. Zielsetzung	86
2.46.2. Aufgabenstellung	87
2.47.1. Zielsetzung	88
2.47.2. Aufgabenstellung	89
2.48.1. Zielsetzung	90
2.48.2. Aufgabenstellung	91
2.49.1. Zielsetzung	92
2.49.2. Aufgabenstellung	93
2.50.1. Zielsetzung	94
2.50.2. Aufgabenstellung	95
2.51.1. Zielsetzung	96
2.51.2. Aufgabenstellung	97
2.52.1. Zielsetzung	98
2.52.2. Aufgabenstellung	99
2.53.1. Zielsetzung	100
2.53.2. Aufgabenstellung	101
2.54.1. Zielsetzung	102
2.54.2. Aufgabenstellung	103
2.55.1. Zielsetzung	104
2.55.2. Aufgabenstellung	105
2.56.1. Zielsetzung	106
2.56.2. Aufgabenstellung	107
2.57.1. Zielsetzung	108
2.57.2. Aufgabenstellung	109
2.58.1. Zielsetzung	110
2.58.2. Aufgabenstellung	111
2.59.1. Zielsetzung	112
2.59.2. Aufgabenstellung	113
2.60.1. Zielsetzung	114
2.60.2. Aufgabenstellung	115
2.61.1. Zielsetzung	116
2.61.2. Aufgabenstellung	117
2.62.1. Zielsetzung	118
2.62.2. Aufgabenstellung	119
2.63.1. Zielsetzung	120
2.63.2. Aufgabenstellung	121
2.64.1. Zielsetzung	122
2.64.2. Aufgabenstellung	123
2.65.1. Zielsetzung	124
2.65.2. Aufgabenstellung	125
2.66.1. Zielsetzung	126
2.66.2. Aufgabenstellung	127
2.67.1. Zielsetzung	128
2.67.2. Aufgabenstellung	129
2.68.1. Zielsetzung	130
2.68.2. Aufgabenstellung	131
2.69.1. Zielsetzung	132
2.69.2. Aufgabenstellung	133
2.70.1. Zielsetzung	134
2.70.2. Aufgabenstellung	135
2.71.1. Zielsetzung	136
2.71.2. Aufgabenstellung	137
2.72.1. Zielsetzung	138
2.72.2. Aufgabenstellung	139
2.73.1. Zielsetzung	140
2.73.2. Aufgabenstellung	141
2.74.1. Zielsetzung	142
2.74.2. Aufgabenstellung	143
2.75.1. Zielsetzung	144
2.75.2. Aufgabenstellung	145
2.76.1. Zielsetzung	146
2.76.2. Aufgabenstellung	147
2.77.1. Zielsetzung	148
2.77.2. Aufgabenstellung	149
2.78.1. Zielsetzung	150
2.78.2. Aufgabenstellung	151
2.79.1. Zielsetzung	152
2.79.2. Aufgabenstellung	153
2.80.1. Zielsetzung	154
2.80.2. Aufgabenstellung	155
2.81.1. Zielsetzung	156
2.81.2. Aufgabenstellung	157
2.82.1. Zielsetzung	158
2.82.2. Aufgabenstellung	159
2.83.1. Zielsetzung	160
2.83.2. Aufgabenstellung	161
2.84.1. Zielsetzung	162
2.84.2. Aufgabenstellung	163
2.85.1. Zielsetzung	164
2.85.2. Aufgabenstellung	165
2.86.1. Zielsetzung	166
2.86.2. Aufgabenstellung	167
2.87.1. Zielsetzung	168
2.87.2. Aufgabenstellung	169
2.88.1. Zielsetzung	170
2.88.2. Aufgabenstellung	171
2.89.1. Zielsetzung	172
2.89.2. Aufgabenstellung	173
2.90.1. Zielsetzung	174
2.90.2. Aufgabenstellung	175
2.91.1. Zielsetzung	176
2.91.2. Aufgabenstellung	177
2.92.1. Zielsetzung	178
2.92.2. Aufgabenstellung	179
2.93.1. Zielsetzung	180
2.93.2. Aufgabenstellung	181
2.94.1. Zielsetzung	182
2.94.2. Aufgabenstellung	183
2.95.1. Zielsetzung	184
2.95.2. Aufgabenstellung	185
2.96.1. Zielsetzung	186
2.96.2. Aufgabenstellung	187
2.97.1. Zielsetzung	188
2.97.2. Aufgabenstellung	189
2.98.1. Zielsetzung	190
2.98.2. Aufgabenstellung	191
2.99.1. Zielsetzung	192
2.99.2. Aufgabenstellung	193
3.00.1. Zielsetzung	194
3.00.2. Aufgabenstellung	195

3.1.1. Zielsetzung

3.1.2. Aufgabenstellung	196
3.2.1. Zielsetzung	197
3.2.2. Aufgabenstellung	198
3.3.1. Zielsetzung	199
3.3.2. Aufgabenstellung	200
3.4.1. Zielsetzung	201
3.4.2. Aufgabenstellung	202
3.5.1. Zielsetzung	203
3.5.2. Aufgabenstellung	204
3.6.1. Zielsetzung	205
3.6.2. Aufgabenstellung	206
3.7.1. Zielsetzung	207
3.7.2. Aufgabenstellung	208
3.8.1. Zielsetzung	209
3.8.2. Aufgabenstellung	210
3.9.1. Zielsetzung	211
3.9.2. Aufgabenstellung	212
3.10.1. Zielsetzung	213
3.10.2. Aufgabenstellung	214
3.11.1. Zielsetzung	215
3.11.2. Aufgabenstellung	216
3.12.1. Zielsetzung	217
3.12.2. Aufgabenstellung	218
3.13.1. Zielsetzung	219
3.13.2. Aufgabenstellung	220
3.14.1. Zielsetzung	221
3.14.2. Aufgabenstellung	222
3.15.1. Zielsetzung	223
3.15.2. Aufgabenstellung	224
3.16.1. Zielsetzung	225
3.16.2. Aufgabenstellung	226
3.17.1. Zielsetzung	227
3.17.2. Aufgabenstellung	228
3.18.1. Zielsetzung	229
3.18.2. Aufgabenstellung	230
3.19.1. Zielsetzung	231
3.19.2. Aufgabenstellung	232
3.20.1. Zielsetzung	233
3.20.2. Aufgabenstellung	234
3.21.1. Zielsetzung	235
3.21.2. Aufgabenstellung	236
3.22.1. Zielsetzung	237
3.22.2. Aufgabenstellung	238
3.23.1. Zielsetzung	239
3.23.2. Aufgabenstellung	240
3.24.1. Zielsetzung	241
3.24.2. Aufgabenstellung	242
3.25.1. Zielsetzung	243
3.25.2. Aufgabenstellung	244
3.26.1. Zielsetzung	245
3.26.2. Aufgabenstellung	246
3.27.1. Zielsetzung	247
3.27.2. Aufgabenstellung	248
3.28.1. Zielsetzung	249
3.28.2. Aufgabenstellung	250
3.29.1. Zielsetzung	251
3.29.2. Aufgabenstellung	252
3.30.1. Zielsetzung	253
3.30.2. Aufgabenstellung	254
3.31.1. Zielsetzung	255
3.31.2. Aufgabenstellung	256
3.32.1. Zielsetzung	257
3.32.2. Aufgabenstellung	258
3.33.1. Zielsetzung	259
3.33.2. Aufgabenstellung	260
3.34.1. Zielsetzung	261
3.34.2. Aufgabenstellung	262
3.35.1. Zielsetzung	263
3.35.2. Aufgabenstellung	264
3.36.1. Zielsetzung	265
3.36.2. Aufgabenstellung	266
3.37.1. Zielsetzung	267
3.37.2. Aufgabenstellung	268
3.38.1. Zielsetzung	269
3.38.2. Aufgabenstellung	270
3.39.1. Zielsetzung	271
3.39.2. Aufgabenstellung	272
3.40.1. Zielsetzung	273
3.40.2. Aufgabenstellung	274
3.41.1. Zielsetzung	275
3.41.2. Aufgabenstellung	276
3.42.1. Zielsetzung	277
3.42.2. Aufgabenstellung	278
3.43.1. Zielsetzung	279
3.43.2. Aufgabenstellung	280
3.44.1. Zielsetzung	281
3.44.2. Aufgabenstellung	282
3.45.1. Zielsetzung	283
3.45.2. Aufgabenstellung	284
3.46.1. Zielsetzung	285
3.46.2. Aufgabenstellung	286
3.47.1. Zielsetzung	287
3.47.2. Aufgabenstellung	288
3.48.1. Zielsetzung	289
3.48.2. Aufgabenstellung	290
3.49.1. Zielsetzung	291
3.49.2. Aufgabenstellung	292
3.50.1. Zielsetzung	293
3.50.2. Aufgabenstellung	294
3.51.1. Zielsetzung	295
3.51.2. Aufgabenstellung	296
3.52.1. Zielsetzung	297
3.52.2. Aufgabenstellung	298
3.53.1. Zielsetzung	299
3.53.2. Aufgabenstellung	300
3.54.1. Zielsetzung	301
3.54.2. Aufgabenstellung	302
3.55.1. Zielsetzung	303
3.55.2. Aufgabenstellung	304
3.56.1. Zielsetzung	305
3.56.2. Aufgabenstellung	306
3.57.1. Zielsetzung	307
3.57.2. Aufgabenstellung	308
3.58.1. Zielsetzung	309
3.58.2. Aufgabenstellung	310
3.59.1. Zielsetzung	311
3.59.2. Aufgabenstellung	312
3.60.1. Zielsetzung	313
3.60.2. Aufgabenstellung	314
3.61.1. Zielsetzung	315
3.61.2. Aufgabenstellung	316
3.62.1. Zielsetzung	317
3.62.2. Aufgabenstellung	318
3.63.1. Zielsetzung	319
3.63.2. Aufgabenstellung	320
3.64.1. Zielsetzung	321
3.64.2. Aufgabenstellung	322
3.65.1. Zielsetzung	323
3.65.2. Aufgabenstellung	324
3.66.1. Zielsetzung	325
3.66.2. Aufgabenstellung	326
3.67.1. Zielsetzung	327
3.67.2. Aufgabenstellung	328
3.68.1. Zielsetzung	329
3.68.2. Aufgabenstellung	330
3.69.1. Zielsetzung	331
3.69.2. Aufgabenstellung	332
3.70.1. Zielsetzung	333
3.70.2. Aufgabenstellung	334
3.71.1. Zielsetzung	335
3.71.2. Aufgabenstellung	336
3.72.1. Zielsetzung	337
3.72.2. Aufgabenstellung	338
3.73.1. Zielsetzung	339
3.73.2. Aufgabenstellung	340
3.74.1. Zielsetzung	341
3.74.2. Aufgabenstellung	342
3.75.1. Zielsetzung	343
3.75.2. Aufgabenstellung	344
3.76.1. Zielsetzung	345
3.76.2. Aufgabenstellung	346
3.77.1. Zielsetzung	347
3.77.2. Aufgabenstellung	348
3.78.1. Zielsetzung	349
3.78.2. Aufgabenstellung	350
3.79.1. Zielsetzung	351
3.79.2. Aufgabenstellung	352
3.80.1. Zielsetzung	353
3.80.2. Aufgabenstellung	354
3.81.1. Zielsetzung	355
3.81.2. Aufgabenstellung	356
3.82.1. Zielsetzung	357
3.82.2. Aufgabenstellung	358
3.83.1. Zielsetzung	359
3.83.2. Aufgabenstellung	360
3.84.1. Zielsetzung	361
3.84.2. Aufgabenstellung	362
3.85.1. Zielsetzung	363
3.85.2. Aufgabenstellung	364
3.86.1. Zielsetzung	365
3.86.2. Aufgabenstellung	366
3.87.1. Zielsetzung	367
3.87.2. Aufgabenstellung	368
3.88.1. Zielsetzung	369
3.88.2. Aufgabenstellung	370
3.89.1. Zielsetzung	371
3.89.2. Aufgabenstellung	372
3.90.1. Zielsetzung	373
3.90.2. Aufgabenstellung	374
3.91.1. Zielsetzung	375
3.91.2. Aufgabenstellung	376
3.92.1. Zielsetzung	377
3.92.2. Aufgabenstellung	378
3.93.1. Zielsetzung	379
3.93.2. Aufgabenstellung	380
3.94.1. Zielsetzung	381
3.94.2. Aufgabenstellung	382
3.95.1. Zielsetzung	383
3.95.2. Aufgabenstellung	384
3.96.1. Zielsetzung	385
3.96.2. Aufgabenstellung	386
3.97.1. Zielsetzung	387
3.97.2. Aufgabenstellung	388

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
<u>KAPITEL 1:</u>	
DROGEN MIT LEBERWIRKSAMKEIT	2
1. Lebererkrankungen	2
2. Lebertherapeutika	3
3. Pflanzliche Lebertherapeutika	5
4. Leberwirksame Drogen	6
4.1. Aus der Volksmedizin bekannte leberwirksame Drogen	6
4.2. Wirkprinzipien einiger leberwirksamer Drogen . . .	6
4.3. Auswahl der Drogen für die eigenen Untersuchungen	13
<u>KAPITEL 2:</u>	
PHARMAKOLOGISCHE TESTMETHODEN	15
1. In vitro-Screening-Test auf antihepatotoxische Ak- tivität nach HIKINO (Hepatozyten-Test)	15
1.1. Prinzip des Tests	15
1.2. Mechanismus der Tetrachlorkohlenstoff-Schädigung .	17
1.3. Mechanismus der Galaktosamin-Schädigung	18
2. Phalloidin-Schädigungsmodelle	18
2.1. In vitro-Test auf Phalloidin-Antagonisierung nach RAO	19
2.2. In vivo-Test an der phalloidinvergifteten Maus . .	20
3. Test auf Stimulierung der RNA-Synthese an Ratten- leberzellkernen nach SONNENBICHLER	20
<u>KAPITEL 3:</u>	
PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON BUTEA MONOSPERMA-BLÜTEN	22
1. Allgemeine Übersicht	22
1.1. Systematik und Verbreitung	22
1.2. Botanische Beschreibung	23
1.3. Volksmedizinische Verwendung	23
1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	26
1.5. Bisherige pharmakologische Untersuchungen	27
2. Phytochemische Untersuchungen	28
2.1. Pharmakologisches Screening und DC-Untersuchungen	28
2.2. Isolierung von Flavonoid 1 und Flavonoid 2	32

	Seite
2.2.1. Präparative HPLC	32
2.2.2. Präparative DC	35
2.3. Strukturaufklärung	35
2.3.1. Flavonoid 1	35
2.3.1.1. FAB-MS	37
2.3.1.2. Mikrohydrolyse	39
2.3.1.3. ¹ H-NMR	40
2.3.2. Flavonoid 2	43
3. Pharmakologische Untersuchungen	47
3.1. Hepatozyten-Test nach HIKINO	47
3.1.1. Ergebnisse	47
3.1.2. Vergleich mit anderen Flavonoiden	48
3.2. Stimulierung der RNA-Synthese in Zellkernen aus Rattenleber nach SONNENBICHLER	49
3.2.1. Ergebnisse	49
3.2.2. Vergleich mit anderen Flavonoiden	51
3.3. Phalloidin-Antagonisierung in vitro nach RAO	52
3.4. Test an der phalloidinvergifteten Maus	52
4. HPLC-Untersuchungen	53
4.1. Analytische HPLC der BuOH-Fraktion	53
4.2. Quantitative Bestimmung von Isobutrin in der BuOH- Fraktion	55
4.3. Quantitative Isobutrin-Bestimmung im MeOH-Extrakt	58

KAPITEL 4 A:

PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON

ECLIPTA ALBA (L.) HASSK.	60
1. Allgemeine Übersicht	60
1.1. Systematische Einteilung und Verbreitung	60
1.2. Botanische Beschreibung	60
1.3. Verwendung in der Volksmedizin und bisherige phar- makologische Untersuchungen	62
1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	63
2. Eigene Untersuchungen	65
2.1. Herstellung einer EtOAc-Fraktion	65
2.2. DC-Untersuchungen	65
2.3. Pharmakologisches Screening	67

	Seite
2.4. Isolierung	68
2.4.1. Säulenchromatographie	68
2.4.2. Präparative Schichtchromatographie	68
2.4.3. Analytische HPLC	69
2.5. Strukturaufklärung	69
2.5.1. E 1	69
2.5.2. E 2 und E 3	70
2.5.2.1. Bewertung der UV- und IR-Spektren	70
2.5.2.2. Darstellung der Acetate von E2 und E3	73
2.5.2.3. Massenspektrometrie	74
2.5.2.4. ^1H -NMR-Spektroskopie	78
2.6. Coumestanvorkommen in Pflanzen	82
2.7. HPLC-Untersuchungen	83
2.7.1. Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion	83
2.7.2. Identifizierung von Phenolcarbonsäuren	85
2.7.2.1. Hydroxybenzoesäuren	85
2.7.2.2. Hydroxyzimtsäureester	85
2.7.3. Quantitative Bestimmung der Coumestane	87
3. Pharmakologische Untersuchungen	91
3.1. Hepatozyten-Test	91
3.1.1. Ergebnisse	91
3.1.2. Vergleichende Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse	93
3.2. Phalloidin-Schädigungsmodelle	96
3.2.1. In vitro-Test nach RAO	96
3.2.2. In vivo-Test an der phalloidinvergifteten Maus	97
3.3. Stimulierung der RNA-Synthese in vitro	98
3.4. In vitro-Inhibition der Prostaglandin- und Leukotrien-Biosynthese	100

KAPITEL 4 B:

UNTERSUCHUNGEN VON WEDELIA CALENDULACEA LESS.	102
1. Allgemeine Übersicht	102
2. Untersuchung von EtOAc-Fractionen	103
3. Nachweis der Coumestane	106

KAPITEL 5:

PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON	
LOPHOPHYTUM LEANDRI EICHL. (FLOR DE PIEDRA)	109
1. Allgemeine Übersicht	109
1.1. Systematik, Verbreitung und botanische Beschreibung	109
1.2. Volksmedizinische Verwendung	110
1.3. Flor de Piedra in der Homöopathie	110
1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	113
2. Eigene Untersuchungen	114
2.1. Lokalisierung des Wirkprinzips	114
2.2. DC-Untersuchungen	115
2.3. Isolierung von Substanz P	115
2.4. Identifizierung von Substanz P	117
2.5. Analytische HPLC	118
2.6. Quantitative Bestimmung	118
3. Pharmakologische Untersuchungen der in Lophophytum	
leandri vorkommenden Verbindungen	121

KAPITEL 6:

UNTERSUCHUNGEN VON EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS . . .	124
1. Allgemeine Übersicht	124
1.1. Systematik, Verbreitung und botanische Beschreibung	124
1.2. Bekämpfung von Eichhornia crassipes	126
1.3. Verwendung in der Volksmedizin und Homöopathie . .	126
1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	127
2. Bestimmung von Pflanzensäuren	128
3. Wirkung der Pflanzensäuren im Hepatozyten-Test . .	131
Z U S A M M E N F A S S U N G	134
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	137
I. Herkunft des Drogenmaterials	137
II. Herkunft der Vergleichssubstanzen	137
III. Allgemeine Arbeitsmethoden	138
1. Dünnschichtchromatographie	138
1.1. Adsorbentien	138
1.2. Auftragechnik	139
2. Säulenchromatographie	139
2.1. Adsorbens	139
2.2. Pack- und Verfahrenstechnik	139

	Seite
3.	HPLC 140
3.1.	Apparative Daten 140
3.2.	Lösungsmittel 140
4.	Physikalisch-chemische Untersuchungen 141
IV.	Spezielle Arbeitsmethoden 142
1.	Untersuchungen von BUTEA MONOSPERMA (Kapitel 3) . . 142
1.1.	Extraktion und Ausschüttelung 142
1.2.	DC-Untersuchungen 142
1.3.	Analytische HPLC 143
1.4.	Isolierung von Flavonoid 1 und Flavonoid 2 144
1.4.1.	Semi-präparative HPLC 144
1.4.2.	Präparative Schichtchromatographie 145
1.5.	Mikrohydrolyse auf der DC-Platte 145
1.6.	Physikalische Daten 146
1.6.1.	Flavonoid 1 (Isobutrin) 146
1.6.2.	Flavonoid 2 (Butrin) 146
1.6.3.	"Flavonoid 3" 147
1.7.	Quantitative HPLC-Bestimmung von Isobutrin 147
2.	Untersuchungen von ECLIPTA ALBA (Kapitel 4 A) . . . 148
2.1.	Extraktion 148
2.2.	Ausschüttelung 149
2.3.	Dünnschichtchromatographie 149
2.4.	Isolierung von E1 - E3 150
2.4.1.	Säulenchromatographie 150
2.4.2.	Präparative Schichtchromatographie von E3 151
2.5.	Acetylierung 151
2.6.	Physikalische Daten 152
2.6.1.	E 1 (Apigenin) 152
2.6.2.	E 2 (Wedelolacton) 153
2.6.3.	E 3 (Desmethywedelolacton) 154
2.7.	HPLC 156
2.8.	Quantitative Bestimmungen 158
2.8.1.	Aufstellung der Eichgeraden 158
2.8.2.	Herstellung von EtOAc 2 159
2.8.3.	Herstellung von EtOAc 3 159
2.8.4.	Coumestan-Bestimmung in EtOAc 1 - 3 160
2.8.5.	Coumestan-Bestimmung im MeOH-Extrakt 160
2.9.	Identifizierung der "Isochlorogensäure-Fraktion" . 160

3.	Untersuchungen von WEDELIA CALENDULACEA (Kapitel 4 B)	161
3.1.	Extraktion und Anreicherung	161
3.2.	Nachweis von Wedelolacton und Desmethylwedelolacton	162
3.2.1.	DC	162
3.2.2.	Isolierung von Desmethylwedelolactonperacetat im Mikromaßstab	162
3.3.	HPLC	162
4.	Untersuchungen von LOPHOPHYTUM LEANDRI (Kapitel 5)	163
4.1.	Extraktion	163
4.2.	Ausschüttelung	163
4.3.	Dünnschichtchromatographie	163
4.4.	Isolierung von Substanz P	164
4.5.	HPLC	165
5.	Untersuchungen von EICHHORNIA CRASSIPES (Kapitel 6)	168
5.1.	Untersuchungen des Frischpflanzenansatzes	168
5.1.1.	Extraktion	168
5.1.2.	DC-Screening	169
5.1.3.	Isolierung und Identifizierung von Kaffeesäure-ethylesterdiacetat	169
5.2.	Untersuchungen der getrockneten Blätter	170
5.2.1.	Extraktion und Ausschüttelung	170
5.2.2.	DC-Untersuchungen	170
5.2.3.	Isolierung der Phenolcarbonsäuren	171
5.2.4.	HPLC	172
V.	Pharmakologische Untersuchungen	176
1.	In vitro-Test mit CCl_4 - und GalN-geschädigten Hepatozyten nach HIKINO	176
2.	Phalloidin-Schädigungsmodelle	176
2.1.	Hepatozyten-Modell nach RAO	176
2.2.	Test an der phalloidinvergifteten Maus	177
3.	Stimulierung der RNA-Synthese in Zellkernen aus Rattenleber nach SONNENBICHLER	178
A N H A N G		179
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		180

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

	Seite
Abb. 1: Formeln der wichtigsten Leberwirkstoffe	12
Abb. 2: BUTEA MONOSPERMA (LAM.) TAUB.	25
Abb. 3: DC-Vergleich des MeOH-Extraktes mit der EtOAc- und der BuOH-Fraktion aus den Blüten von Butea monosperma	29
Abb. 4: DC der BuOH-Fraktion auf RP18-Schichten	31
Abb. 5: Analytische HPLC-Trennung der BuOH-Fraktion . . .	32
Abb. 6: Semi-präparative HPLC-Trennung der BuOH-Fraktion und DC der Fraktionen	34
Abb. 7: Bei der HPLC-Trennung on-line aufgenommenes UV- Spektrum von Flavonoid 1	36
Abb. 8: Negatives FAB-MS von Flavonoid 1	38
Abb. 9: Nachweis von Glucose nach Mikrohydrolyse von Fla- vonoid 1	39
Abb. 10: ¹ H-NMR-Spektrum von Flavonoid 1 (Ausschnitt). . .	40
Abb. 11: Struktur von Flavonoid 1 (Isobutrin).	42
Abb. 12: On-line registriertes UV-Spektrum von Flavonoid 2	43
Abb. 13: IR-Spektrum von Flavonoid 2	44
Abb. 14: Struktur von Flavonoid 2 (Butrin)	46
Abb. 15: Zeitverlauf des ³ H-UTP-Einbaus in die RNA von Rattenleberzellkernen in Gegenwart von Substan- zen aus Butea monosperma	50
Abb. 16: Effekt des MeOH-Extraktes aus Butea monosperma- Blüten auf die phalloidinvergiftete Maus	52
Abb. 17: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der BuOH-Frak- tion in zwei Trennsystemen	54
Abb. 18: Chromatographische Reinheit des isolierten Isobu- trins (Detektion bei verschiedenen Wellenlängen).	56
Abb. 19: Eichgerade von Isobutrin.	56
Abb. 20: HPLC-Chromatogramm des Methanolextraktes aus Bu- tea monosperma-Blüten	59
Abb. 21: ECLIPTA ALBA (L.) HASSK.	61
Abb. 22: DC-Trennung der EtOAc-Fraktion aus Eclipta alba .	66
Abb. 23: Strukturformel von Apigenin (E1)	70
Abb. 24: IR-Spektren von E2 und E3	72
Abb. 25: DC von E2- und E3-Acetat	73

	Seite
Abb. 26: IR-Spektrum von E3-Acetat	74
Abb. 27: Massenspektren von E2-Acetat und E3-Acetat . . .	76
Abb. 28: Struktur von Wedelolacton (E2).	79
Abb. 29: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren von E2-Acetat und E3-Acetat	80
Abb. 30: Struktur von Desmethylwedelolacton (E3)	82
Abb. 31: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat-Fraktion von Eclipta alba und UV-Spektren der Hauptpeaks . . .	84
Abb. 32: HPLC-Chromatogramm der "Isochlorogensäuren" und UV-Spektren der Hauptpeaks	86
Abb. 33: Eichgerade von Wedelolacton	88
Abb. 34: HPLC-Fingerprint des Methanolextraktes von Eclip- ta alba	90
Abb. 35: Effekt der EtOAc-Fraktion auf Phalloidin-indu- zierte Schädigungen von Hepatozyten	96
Abb. 36: Effekt der EtOAc-Fraktion auf die phalloidinver- giftete Maus (Todesraten)	97
Abb. 37: Zeitverlauf des Einbaus von ^3H -UTP in die RNA von Rattenleberzellkernen in Gegenwart von Substanzen aus Eclipta alba	99
Abb. 38: Herstellung von EtOAc-Fractionen aus Wedelia ca- lendulacea	104
Abb. 39: HPLC-Fingerprints der EtOAc-Fractionen W2 und W3 aus Wedelia calendulacea	108
Abb. 40: LOPHOPHYTUM LEANDRI EICHL.	111
Abb. 41: DC der EtOAc-Fraktion aus Lophophytum leandri . .	116
Abb. 42: Struktur von Protocatechusäure	117
Abb. 43: HPLC-Fingerprint der EtOAc-Fraktion aus Lophophy- tum leandri und UV-Spektren der Hauptpeaks . . .	119
Abb. 44: EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS	125
Abb. 45: DC-Skizze der in der EtOAc-Fraktion nachgewiesen- en Phenolcarbonsäuren	130
Abb. 46: HPLC-Fingerprint der EtOAc-Fraktion aus Eichhor- nia crassipes und Zuordnung der identifizierten Pflanzensäuren	132
Abb. 47: Eichgeraden für die quantitative Bestimmung der Protocatechusäure und der Flavonoide aus Lopho- phytum leandri	167
Abb. 48: Eichgeraden zur Bestimmung der Hydroxybenzoesäu- ren in Eichhornia crassipes	174

VERZEICHNIS DER TABELLEN

	Seite
Tab. 1: Volksmedizinisch bekannte Drogen mit zugeschriebenen hepatotropen Eigenschaften	7
Tab. 2: Wirkprinzipien aus pflanzlichen Leberdrogen . . .	9
Tab. 3: Bekannte Flavonoide aus den Blüten von <i>Butea monosperma</i>	26
Tab. 4: Antihepatotoxische Aktivität der Extrakte aus <i>Butea monosperma</i> -Blüten gegen CCl_4 - und GalN -induzierte Zytotoxizität in Rattenhepatozyten . . .	28
Tab. 5: Detektionsverhalten von Flavonoid 1 und 2	30
Tab. 6: Bathochrome Verschiebungen von Bande I von Flavonoid 1	36
Tab. 7: ^1H -NMR von Flavonoid 1	41
Tab. 8: Charakteristische Fragmente im FAB-MS von Flavonoid 2 (Negativionen-Detektion).	44
Tab. 9: ^1H -NMR von Flavonoid 2	45
Tab. 10: Antihepatotoxische Aktivität von Butrin und Isobutrin im Hepatozyten-Testmodell	47
Tab. 11: Gehaltsbestimmung von Isobutrin in der BuOH-Fraktion	57
Tab. 12: Bisher bekannte Inhaltsstoffe von <i>Eclipta alba</i> . .	64
Tab. 13: Detektionsverhalten von E1 - E5	66
Tab. 14: Wirkung der EtOAc-Fraktion im Hepatozyten-Test . .	68
Tab. 15: Bathochrome Verschiebungen von Bande I von E2 und E3 mit Shiftreagentien	71
Tab. 16: Fragmentationen im MS und ihre Zuordnung	77
Tab. 17: ^1H -NMR-Daten der nicht aromatischen Protonen von E2- und E3-Acetat.	81
Tab. 18: Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der Coumestane in verschiedenen EtOAc-Fractionen aus <i>Eclipta alba</i> . .	89
Tab. 19: Antihepatotoxische Wirkung von Substanzen aus <i>Eclipta alba</i> im Hepatozyten-Test	92
Tab. 20: Stimulierung des ^3H -UTP-Einbaus in die RNA von Zellkernen nach 15-minütiger Inkubation	100
Tab. 21: Antihepatotoxische Aktivität der EtOAc-Fraktion W2 aus <i>Wedelia calendulacea</i>	105
Tab. 22: Wirkung von Extrakten aus <i>Lophophytum leandri</i> auf CCl_4 - und GalN -geschädigte Hepatozyten	114

Tab. 23: Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der in Lophophytum leandri enthaltenen Verbindungen	120
Tab. 24: Wirkung von Substanzen aus Lophophytum leandri im Hepatozyten-Test	121
Tab. 25: Antihepatotoxische Aktivität der in Eichhornia crassipes nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren . . .	133
Tab. 26: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Isobutrin im MeOH-Extrakt	148
Tab. 27: Rf-Werte der in Lophophytum leandri nachgewiesenen Verbindungen	164
Tab. 28: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Hydroxybenzoesäuren in der EtOAc-Fraktion aus Eichhornia crassipes-Blättern	175

E I N L E I T U N G

Die Einführung des aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. isolierten Leberwirkstoffkomplexes Silymarin in die Therapie von Lebererkrankungen hat zu einer intensiven Suche nach weiteren potentiellen Leberwirkstoffen geführt.

Nachdem durch Screening-Untersuchungen im Arbeitskreis des Instituts festgestellt werden konnte, daß die Extrakte der aus Indien stammenden Drogen *Butea monosperma* (Lam.) Taub., *Eclipta alba* (L.) Hassk. und *Wedelia calendulacea* Less. sowie der in Südamerika heimischen Droge *Flor de Piedra* (Lophophytum leandri Eichl.) über gute hepatotrope Wirkungen verfügten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht werden, die Wirkprinzipien dieser Drogen zu isolieren, strukturell aufzuklären und pharmakologisch auf ihre Leberwirkungen hin zu untersuchen.

Als weitere Droge wurde die in der Homöopathie verwendete Pflanze *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms mit in die Untersuchungen einbezogen, da sie außer bei Störungen der Pankreasfunktion auch bei Hepatitis eingesetzt wird.

Soweit die Lokalisierung der Wirkprinzipien gelingen sollte, waren für alle Drogenextrakte HPLC-Fingerprintanalysen und Standardisierungsverfahren auszuarbeiten.

A L L G E I M E I N E R T E I L

KAPITEL 1:

DROGEN MIT LEBERWIRKSAMKEIT

1. Lebererkrankungen

Die wichtigsten Formen der Lebererkrankungen (allgemein: Hepatopathien) sind Hepatitis, Hepatose und Leberzirrhose.

Unter dem Begriff "Hepatitis" faßt man eine Reihe von entzündlichen Lebererkrankungen zusammen. Betroffen sind vornehmlich das Mesenchym (der Gefäß-Bindegewebsapparat) und das Kupffer'sche Sternzellsystem.

Die akute Hepatitis wird durch Viren ausgelöst. Man unterscheidet den Typ A (Hepatitis epidemica), den Typ B (Serumhepatitis, die bei Impfungen und Bluttransfusionen übertragen werden kann), sowie den Typ NON-A-NON-B. Sie ist meist von einem Ikterus ("Gelbsucht") begleitet. Es gibt auch anikterische und cholestatische Verlaufsformen sowie die maligne nekrotisierende Hepatitis.

Reaktive Hepatitiden sind Begleiterscheinungen von extrahepatischen Krankheiten, z.B. Infektionskrankheiten, Magen-Darm-Erkrankungen und Pilz- und Wurmerkrankungen.

Chronische Hepatitiden können persistierend, aggressiv-progredient oder selten malign nekrotisierend verlaufen.

Die Hepatose (Leberzellschädigung) umfaßt ein Krankheitsbild, das durch eine nutritiv-toxische und degenerative Schädigung des Leberparenchyms charakterisiert ist. Häufige Begleiterscheinungen sind Fettleber und Leberzirrhose. Durch medikamentös-toxische Schäden und Gewerbegifte entsteht die cholestatische Hepatose.

Das Endstadium vieler chronischer Hepatitiden und toxischer Hepatosen ist die Leberzirrhose (Degeneration des Leberparenchyms), wie z.B. die nach chronischem Alkoholabusus auftretende Alkoholzirrhose. Durch fibröse Narbenbildung kommt es in der Leber zu einer Durchblutungsminderung. Unter Schrumpfung des Organs entsteht aus dem Parenchym ein funktionsloses Narbengewebe und es kann zum Untergang größerer Gewebsareale und sogar zur Zerstörung der Leberläppchen kommen. (1,2)

2. Lebertherapeutika

Auf kaum einem Therapiegebiet sind die Meinungen über den Effekt einer Therapie so geteilt wie auf dem der Lebererkrankungen (1,4,54,135).

Angesichts der sehr hohen Selbstregenerationsfähigkeit der Leber und der Neigung vieler Hepatopathien zu Spontanremissionen wird von einigen Hepatologen jede medikamentöse Behandlung als wenig effizient abgelehnt. Andererseits sind allein in der Roten Liste 1985 (3) nicht weniger als 180 Fertigarzneimittel des Handels zur Behandlung von Lebererkrankungen aufgeführt, d.h. daß eine medikamentöse Therapie in hohem Maße betrieben wird. In der Roten Liste sind diese Präparate unter den Stichworten "Lebertherapeutika" und "Lösungen in der Lebertherapie" aufgelistet. Eine Einteilung dieser Fertigarzneimittel nach Indikationsgebieten ist schwierig, da es zahlreiche Überschneidungen mit Präparaten anderer Indikationsgebiete gibt. In der Roten Liste werden unter "Lebertherapeutika" auch einige Präparate der Indikationsgruppen Laxantia, Cholagoga, Lipidsenker oder Vitamine aufgeführt.

Auch eine Einteilung der Lebertherapeutika nach den verschiedenen Krankheitsbildern bereitet Schwierigkeiten, da diesen selten eng umschriebene pathophysiologische Erscheinungsformen entsprechen (s. z.B. bei (248)).

Die nachfolgend gegebene Einteilung erfüllt daher einen formal-didaktischen Zweck:

1. "Leberschutztherapeutika"
2. Therapeutika zur Prophylaxe von Lebererkrankungen, z.B. Impfstoffe (4)
3. Präparate gegen entzündliche Lebererkrankungen, z.B. Antiphlogistika und Immunsuppressiva (Glucocorticoide, D-Penicillamin, Azathioprin und Cyclosporin A (249))
4. Präparate gegen chronisch-degenerative Lebererkrankungen, z.B. anabole Steroide

KOCH (1) dagegen faßt in einer Übersicht alle Lebertherapeutika unter dem Begriff der "Leberschutztherapeutika" zusammen. Die "Leberschutztherapie" zielt nach KOCH auf eine Unterstützung und Förderung des Heilungsprozesses unter Verminderung der Folgeerscheinungen von Lebererkrankungen. Dabei soll die Selbstregeneration des Leberparenchyms beschleunigt, die Entartung des spezifischen Lebergewebes durch Bindegewebeinlagerung herabgesetzt und die Fettinfiltration beseitigt werden, mit dem Ziel, die Stoffwechsel- und Entgiftungsfunktionen der Leber voll wiederherzustellen (s. auch (135)).

KOCH teilt die Leberschutztherapeutika teils nach chemischen, teils nach therapeutischen Gesichtspunkten in 11 Gruppen ein:

1. Leberextrakte und -hydrolysate
2. Ammoniaksenker, z.B. Aminosäuren wie Arginin und Ornithin sowie Dicarbonsäuren des Citratzyklus wie L-Äpfelsäure
3. Lipotrope Substanzen, d.h. Wirkstoffe, die bei der Leberverfettung den Fettabbau beschleunigen sollen, hierzu gehören z.B. essentielle Phospholipide (EPL-Substanz), Methionin, Cystein, Cholin, Glutathion und α -Liponsäure (=Thioctsäure)
4. Vitamine, z.B. Vitamin B12, C und E, und Antioxidantien
5. Zucker und Zuckeralkohole, z.B. Laevulose, Inosit, Lactulose
6. Pyrimidin- und Purinderivate, z.B. Orotsäure und -salze
7. Hepatotrope Pflanzenstoffe (s. 3.)
8. Steroidhormone und Immunsuppressiva
9. Enzyminduktoren
10. Gammaglobulin und Interferon
11. Andere hepatotrope Wirkstoffe, z.B. Gallensäuren, Dextran, Hämatoporphyrin u.a. Roborantien, Antibiotika und Diuretika

Dem Begriff des Leberschutzes kommt die heute häufig verwendete Bezeichnung "antihepatotoxisch" am nächsten, während man als "hepatotrop" solche Stoffe bezeichnet, die allgemein günstig auf die Leber einwirken.

Antihepatotoxische Wirkungen werden so gemessen, daß man in Versuchstieren, meist Ratten, durch Applikation verschiedener Lebergifte, z.B. Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Ethanol, Phalloidin, α -Amanitin oder Galaktosamin, experimentelle Leberschäden erzeugt. Die Schutzwirkung der meist präventiv verabreichten "Leberschutzstoffe" wird z.B. durch Messung von Überlebensraten oder Enzymparametern sowie durch histochemische Befunde ermittelt.

3. Pflanzliche Lebertherapeutika

Von diesen sind nach der Roten Liste (3) nur drei Fertigarzneimittel als Monopräparate im Handel: Legalon[®], DuraSilymarin und Mariendistel-Tropfen Curarina. Diese Präparate enthalten als Wirkstoff Silymarin aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn.. Silymarin ist ein hauptsächlich aus drei isomeren Flavonolignanen bestehender Wirkstoffkomplex. Es stellt das am besten pharmakologisch und klinisch untersuchte Lebertherapeutikum pflanzlicher Herkunft dar (1,5-11,55,86,202).

Ein weiteres Monopräparat ist das Catergen[®], dessen Wirkstoff ((+)-Cyanidanol-3, (+)-Catechin) im Pflanzenreich sehr weit verbreitet vorkommt (1,5). Das Präparat wurde in zahlreichen Tierversuchen und klinischen Studien auf Wirksamkeit und Toxizität geprüft (5,12,13,56). Auch die Pharmakokinetik der Substanz ist weitgehend bekannt (13). Zur Zeit wird ein lipophiles Derivat, das 3-Palmitoyl-(+)-catechin, klinisch geprüft. Im September 1985 wurde jedoch das Ruhen der Zulassung für das Präparat durch das BGA veranlaßt, um die Ursache einiger in Italien aufgetretener Fälle von schweren Nebenwirkungen (Anämien) mit teilweise tödlichem Ausgang aufzuklären, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer Catergen[®]-Therapie stehen (104).

Die Zahl der in den pflanzlichen Kombinationspräparaten verwendeten Drogen ist kaum überschaubar. Teilweise sind zehn und mehr meist sehr niedrig dosierte Pflanzenextrakte kombiniert. In diesen pflanzlichen Lebertherapeutika befinden sich überwiegend Chologoga, Choleretika, Laxantien, Diuretika und Carminativa (Etherisch-Öl- und Bitterstoffdrogen) als Kombinationspartner. Als eigentliche "Leberdrogen" sind hier nur *Silybum marianum* (Mariendistel) und *Cynara scolymus* (Artischocke) zu finden (5,29,244,245).

Es gibt auch über 20 Fertigarzneimittel, in denen Pflanzenextrakte mit einer Vielzahl anderer Verbindungen der unterschiedlichsten Stoffklassen kombiniert werden.

Beispiele für solche Stoffe sind: Enzyme, Vitamine (besonders der B-Reihe und Vitamin E), Spurenelemente, Aminosäuren, Cholin und Cholinorotat, ungesättigte Fettsäuren, Phospholipide, Zucker und Zuckeralkohole, Purin- und Pyrimidinderivate, Pro-

cain, Lecithin, Bisacodyl, Gallensäuren, Frischleberextrakte und -hydrolysate sowie homöopathische Zubereitungen.

4. Leberwirksame Drogen

4.1. Aus der Volksmedizin bekannte leberwirksame Drogen

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Drogen aufgelistet, die volksmedizinisch als Leberdrogen angewandt und häufiger in der Literatur erwähnt werden. Darin sind ohne Einteilung alle Drogen aufgeführt, die in der Literatur als hepatotrop beschrieben wurden. Viele "Leberdrogen" stammen aus dem Erfahrungsschatz der traditionellen Heilkunde Asiens, besonders Indiens und Chinas, sowie des Orients und Südamerikas. Als häufigste Indikationsangaben für diese Drogen findet man Hepatitis und "jaundice" (Gelbsucht).

Eine Übersicht über Drogen, die sich bei einem pharmakologischen Screening in einem Leberschädigungsmodell (Antagonisierung der Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Schlafzeitverlängerung nach Hexobarbitalnarkose bei Mäusen *in vivo*) als wirksam erwiesen haben, gibt CHANG (14,17). In Tabelle 1 sind diese Drogen mit einem Sternchen (*) markiert.

Vereinzelt liegen auch klinische Erfahrungsberichte über die hepatotrope Wirkung von einigen chinesischen Drogen bei verschiedenen Lebererkrankungen vor (17).

4.2. Wirkprinzipien einiger leberwirksamer Drogen

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die wichtigsten, bisher als antihepatotoxisch erkannten Wirkprinzipien von Leberdrogen aufgeführt. Ein großer Teil potentieller Wirkstoffe ist in der letzten Zeit durch die Arbeiten von HIKINO und KISO und Mitarb. mit Hilfe von in vitro-Testmodellen (s. Kapitel 2) aufgefunden worden (17,21).

Für einige Drogenextrakte existieren auch pharmakologische in vivo-Untersuchungen (17,25,26,52).

Die Formeln der wichtigsten Leberwirkstoffe sind in Abbildung 1 (S. 12) wiedergegeben.

Tabelle 1: Volksmedizinisch bekannte Drogen mit zugeschriebenen hepatotropen Eigenschaften

Droge	Familie	Literatur
<i>Agrimonia eupatoria</i>	Rosaceae	15, 16
<i>Alisma orientale</i> *	Alismataceae	14, 17
<i>Allophylus edulis</i>	Sapindaceae	18
<i>Angelica sinensis</i>	Apiaceae	17
<i>Artemisia capillaris</i>	Asteraceae	17, 20, 21
<i>Astragalus membranaceus</i>	Fabaceae	17,
<i>Atractylodes japonica</i> *	Asteraceae	14, 17, 21, 22
<i>Aucuba japonica</i>	Cornaceae	17
<i>Berberis asiatica</i>	Berberidaceae	16, 23, 24
<i>Bupleurum falcatum</i>	Apiaceae	5, 17, 23, 25, 26
<i>Butea monosperma</i>	Fabaceae	16, 27
<i>Cassia tora</i> *	Fabaceae	14, 17, 23
<i>Cibotium varometz</i> *	Polypodiaceae	14, 17, 23
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	3, 17, 21, 23, 28
<i>Cynara scolymus</i>	Asteraceae	3, 5, 29, 30
<i>Cyperus rotundus</i> *	Cyperaceae	14, 16, 17
<i>Eclipta alba</i>	Asteraceae	5, 16, 23, 24, 31, 32, 33
<i>Garcinia kola</i>	Guttiferae	139
<i>Gentiana scabra</i> *	Gentianaceae	14, 17
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabaceae	3, 16, 21, 38

Tabelle 1: Volksmedizinisch bekannte Drogen mit zugeschriebenen hepatotropen Eigenschaften
(Fortsetzung)

Droge	Familie	Literatur	
Lophophytum leandri	Balanophoraceae	34, 35, 39, 40	1
Panax ginseng *	Araliaceae	5, 14, 17	∞
Picrohiza kurrooa *	Scrophulariaceae	5, 14, 16, 17, 41, 42, 240	1
Phyllanthus niruri	Euphorbiaceae	16, 23, 24, 33, 43, 44	
Plantago asiatica *	Plantaginaceae	5, 14, 17, 46	
Polygonatum japonicum *	Liliaceae	14, 17	
Salvia miltiorrhiza *	Lamiaceae	14, 17	
Scutellaria baicalensis *	Lamiaceae	14, 17, 19	
Schizandra chinensis	Schizandraceae	5, 17, 21, 47, 48, 49	
Taraxacum officinale	Asteraceae	3, 16, 23, 29, 37, 50	
Tetrapanax papyrifera	Araliaceae	51	
Thujopsis dolabrata	Cupressaceae	5, 52	
Wedelia calendulacea	Asteraceae	16, 23, 31	
Wikstroemia viridiflora	Thymelaeaceae	47	

Tabelle 2: Wirkprinzipien aus pflanzlichen Leberdrogen

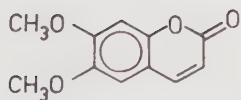
Pflanze (Familie)	Wirkverbindungen	Stoffklasse	Literatur
Artemisia capillaris (Asteraceae)	Capillarisin, Arcapillin, Quercetin, Isorhamnetin, Isorhamnetin-3-glucosid, Cacticin	Flavonoide (Flavone, Flanonole)	17, 20, 21
	6, 7-Dimethylesculetin	Cumarine	
Atractylodes-Arten (A. japonica, lancea und macrocephala) (Asteraceae)	Atractylon, β -Eudesmol Hinesol	Sesquiterpene	17, 21, 22
Aucuba japonica (Cornaceae)	Aucubin	Iridoidglykosid	17
Bupleurum falcatum (Apiaceae)	Saikosaponin a und d	Triterpen- Saponine	5, 17, 25, 26, 84
Curcuma longa (Zingiberaceae)	Curcumin, p-Cumaroyl- feruloylmethan, Di-p- Cumaroylmethan	Curcuminoid	5, 17, 21, 28
	Kaffeesäure, Ferulasäure	Phenolcarbon- säuren	
Cynara scolymus (Asteraceae)	Cynarin	Phenolcarbon- säureester	5, 29, 244, 245

Tabelle 2: Wirkprinzipien aus pflanzlichen Leberdrogen (Fortsetzung)

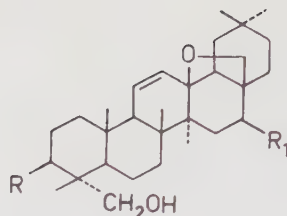
Pflanze (Familie)	Wirkverbindungen	Stoffklasse	Literatur
Gardenia jasminoides (Rubiaceae)	Geniposid	Iridoidglykosid	17
Glycyrrhiza glabra (Fabaceae)	Glycyrrhetin, Glycyrrhizinsäure	Triterpen-saponine	17, 21, 38
Panax ginseng (Araliaceae)	Ginsenosid Rg ₁ , Rg ₂ , Rg ₃ , Protopagenin von Ginsenosid-Rh ₁ und Rh ₂ u.a. Ginsenoside	Triterpen-saponine	5, 17
Picrothiza kurroa (Scrophulariaceae)	Picrosid I (6'-Cinnamoylcatalpol), Picrosid II (6-Vanilloylcatalpol)	Iridoide	5, 17, 42
Plantago asiatica (Plantaginaceae)	Aucubin	Iridoidglykosid	5, 17, 46
Salvia plebeia (Lamiaceae)	Eupafolin, Hispidulin, Homoplantagin	Flavonoide (Flavone)	83
Schizandra chinensis (Schizandraceae)	Schizanthrin D, Gomisin C und N, Schizandrin B, Wuweizisu C, Deoxygomisin A, Schizandrin B u.a. Schizandrine	Lignane	5, 17, 21, 47, 48, 49

Tabelle 2: Wirkprinzipien aus pflanzlichen Leberdiogen (Fortsetzung)

Pflanze (Familie)	Wirkverbindungen	Stoffklasse	Literatur
<i>Silybum marianum</i> (Asteraceae)	Silybin und dessen Isomere	Flavonolignane	5-9, 17, 55, 85, 86, 192, 202
<i>Sweetia japonica</i> (Gentianaceae)	Amarogentin Sweetiajaponin, Sweetisin, Rhomontentin Bellidifolin, Methylswertianin	Tridoid Flavonoide (Flavon C-glyk.) Xanthone	17, 53
<i>Tetrapanax papyriferum</i> (Araliaceae)	Papyriogenin A, B, C, Propapyriogenin A1, A2, 11-Behydropropapyriogenin A2	Triterpen-saponine	17, 51
<i>Thuopsis dolabrata</i> (Cupressaceae)	Desoxypodophyllotoxin	Lignan	5, 17, 52
<i>Wikstroemia viridiflora</i> (Thymelaeaceae)	Wikstroemin	Flavonoid	47



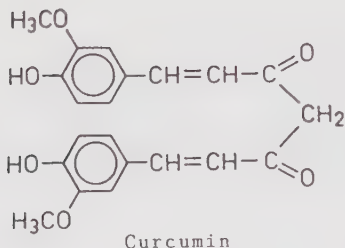
6,7-Dimethylesculetin



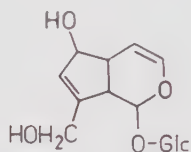
$R = D\text{-Glc}(p) \xrightarrow{\beta} 3 \text{ D-Fuc}(p) \xrightarrow{\beta}$

Saikosaponin a: $R_1 = \beta\text{-OH}$

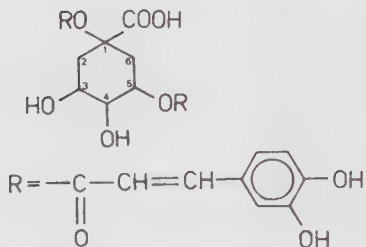
Saikosaponin d: $R_1 = \alpha\text{-OH}$



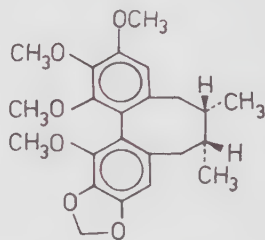
Curcumin



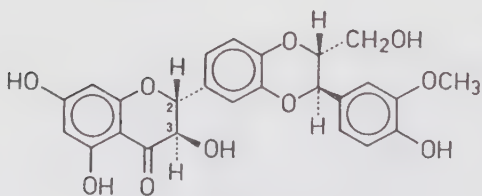
Aucubin



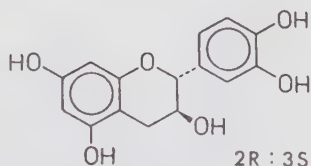
Cynarin



Schizandrin B



Silybin



2R : 3S

(+)-Catechin
((+)-Cyanidanol-3, Catergen®)

Abb. 1: Formeln der wichtigsten Leberwirkstoffe

4.3. Auswahl der Drogen für die eigenen Untersuchungen

Auf der Suche nach neuen Leberwirkstoffen in Pflanzen kann man folgenden vier Leitlinien folgen:

1. Man orientiert sich an der Erfahrungsheilkunde und wählt für die Untersuchungen solche Drogen aus, die empirisch schon lange Zeit bei verschiedenen Lebererkrankungen verwendet wurden. Dies setzt eine systematische Literaturrecherche voraus.
2. Man sucht nach Pflanzeninhaltsstoffen, die mit bekannten Leberwirkstoffen strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Ausgehend von den leberwirksamen Verbindungen Silybin, Catechin, Cynarin (244,245), Schizandrin B (5,17,48) und den Saikosaponinen (25,26,84) wäre z.B. die Suche in der Stoffklasse der Flavonoide, Cumarine, Curcuminoiden, Lignane, Phenolcarbonsäuren oder Saponine sinnvoll.
3. Man folgt Hinweisen aus der Literatur, in der die Leberwirksamkeit einer Droge durch pharmakologische Untersuchungen bereits nachgewiesen wurde, aber Wirkprinzipien der Drogen nicht identifiziert oder näher charakterisiert werden konnten.
4. Man untersucht Drogen, die in der Homöopathie gegen Leberkrankheiten verwendet werden, muß hier allerdings berücksichtigen, daß die Wirkmechanismen nicht die gleichen wie bei allopathischer Anwendung sein müssen.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen uns die Ergebnisse eines Drogenscreenings vor, das von FIEBIG (6) in unserem Arbeitskreis durchgeführt worden war. Vier Drogen, die nach den oben genannten Kriterien ausgesucht worden waren und deren Extrakte bzw. Fraktionen sich bei diesem Screening in verschiedenen Testmodellen als antihepatotoxisch wirksam erwiesen, bzw. die die Leberregenerationsfähigkeit durch Steigerung der RNA-Synthese in vitro stimuliert hatten, wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Diese vier Drogen sind:

Butea monosperma (Kapitel 3)

Eclipta alba (Kapitel 4 A)

Wedelia calendulacea (Kapitel 4 B)

Lophophytum leandri (Flor de Piedra) (Kapitel 5)

Als fünfte Droge wählten wir außerdem die phytochemisch kaum bearbeitete, in der Homöopathie u.a. gegen Folgeerscheinungen von Lebererkrankungen, z.B. Magen-Darm-Störungen nach einer Hepatitis oder Hepatose, eingesetzte Droge Eichhornia crassipes aus (34-37) (Kapitel 6).

KAPITEL 2:

PHARMAKOLOGISCHE TESTMETHODEN

Vorraussetzung für die Auffindung neuer leberwirksamer Substanzen aus pflanzlichen Drogen sind geeignete Testmodelle für das Screening von Extrakten und Fraktionen und für die spätere Testung von Substanzgemischen und Reinsubstanzen auf antihepatotoxische oder anderweitig hepatotrope Aktivität.

Im Folgenden werden die von uns eingesetzten in vitro- und in vivo-Testsysteme vorgestellt.

1. In vitro-Screening-Test auf antihepatotoxische Aktivität nach HIKINO (Hepatozyten-Test (21,57,58,59))*

1.1. Prinzip des Tests

Bei diesem Test werden die Versuche an isolierten, kultivierten Hepatozyten vorgenommen, die aus der Leber erwachsener Wistar-Ratten gewonnen werden. Hepatozyten werden heute nach einer 1969 von BERRY und FRIEND (60) entwickelten Methode isoliert. Diese Methode wurde später von SEGLEN (61) wesentlich verbessert und modifiziert. Sie beruht auf einer Zirkulations-Perfusion der isolierten Leber mit collagenasehaltigen Puffern.

Hepatozytenkulturen sind ein gründlich untersuchtes und überschaubares in vitro-Modell, das sich für die verschiedensten pharmakologischen und biochemischen Fragestellungen eignet. Beispiele hierfür sind bei (62-69) und (93) zu finden.

Das Prinzip des Tests beruht auf einer Schädigung der kultivierten Hepatozyten mit Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) oder D-Galaktosamin (GalN), zwei bekannten hepatotoxischen Agentien mit unterschiedlichem Schädigungsmechanismus (s. 1.2.).

Das Ausmaß der Leberschädigung korreliert mit dem Austritt der leberspezifischen, cytosolischen Transaminase GPT durch die geschädigte Plasmamembran der Hepatozyten (69,70,98). Der GPT-Spiegel im Medium wird gemessen.

* Wir sind Prof. Hiroshi Hikino, Sendai, Japan, für die Durchführung der zahlreichen Tests sehr zu Dank verpflichtet.

Die antihepatotoxische Wirkung einer protektiv zugesetzten Probe äußert sich in einer durch "Schutz" der Hepatozyten bedingten Hemmung der Freisetzung der cytoplasmatischen GPT. Das Ergebnis des Tests, die Enzymaktivität in U/l, wird auf den mit 100 % angesetzten GPT-Spiegel im Kontrollmedium nach reiner Schädigung der Zellen mit CCl_4 bzw. GalN bezogen.

HIKINO spricht von starker antihepatotoxischer Aktivität bei Werten von weniger als 50 % der Kontrollen (57).

GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase, auch ALAT (Alanin-Aminotransferase) genannt (102,246)) ist ein Enzym, das bei den meisten Warmblütern in der Leber am höchsten konzentriert vorkommt, jedoch auch in anderen Organen, z.B. Niere, Herz, Skelettmuskel, Pankreas und Milz, zu finden ist. Der GPT-Spiegel dient häufig als Index von Leberstörungen sowohl im Tiermodell als auch bei der Diagnose menschlicher Leberkrankheiten, z.B. ist der Serum-GPT-Spiegel (SGPT) wichtig zur Früherfassung der akuten Hepatitis, die immer mit einem Transaminaseanstieg verbunden ist (70,71,81,246). Typische Enzymmuster im Serum und Quotienten wie z.B. der DeRitis-Quotient GOT/GPT spielen eine wichtige Rolle bei der Diagnose, Verlaufbeobachtung und Therapiekontrolle verschiedener Lebererkrankungen beim Menschen. Bei in vivo-Versuchen an der Ratte treten sowohl nach CCl_4 - wie auch nach GalN -erzeugten Leberschäden dosisabhängig stark erhöhte Transaminasespiegel im Serum auf (69,71,75,98,99,102).

Da ein positives Testergebnis dadurch vorgetäuscht werden kann, daß die zugesetzten Proben lediglich eine Enzymhemmung bewirken, wie es z.B. für einige Flavonoide in der Literatur beschrieben ist (103,141), wird die direkte enzyminhibitorische Aktivität der Proben in einer zweiten Versuchsreihe durch die Messung des direkten Einflusses auf die Enzymaktivität von GPT in einem Standardmedium bestimmt und ebenfalls in Prozent der Kontrollen ausgedrückt.

Die Vorteile gegenüber den bisherigen in vivo-Modellen sind:

1. Die Methode ist gut reproduzierbar.
2. Man benötigt für ein vollständiges Screening nur wenig Substanz (etwa 8 mg).
3. Es müssen nur wenige Tiere für die Versuche getötet werden, da man Hepatozytenkulturen verwendet.
4. Viele Proben können gleichzeitig unter denselben Bedingungen getestet werden. Die aus der Leber einer Ratte gewonnenen Hepatozyten reichen für über 300 Versuchsansätze.

Die Nachteile dieses Testmodells decken sich mit den meisten anderen in vitro-Versuchen:

1. Die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit läßt sich nicht vermitteln. Im Test werden solche Verbindungen nicht erfaßt, die erst nach Metabolisierung in die Wirkform übergehen.
2. Man erhält positive Ergebnisse auch durch Substanzen, die nur durch Reaktion mit den toxischen Agentien deren Inaktivierung bewirken.

1.2. Mechanismus der Tetrachlorkohlenstoff-Schädigung

Die Schädigung der Rattenleber mit CCl_4 wird sehr häufig als Modell zur experimentellen Erzeugung von Hepatotoxizität verwendet. Der in vivo- und in vitro-Schädigungsmechanismus von CCl_4 war Gegenstand zahlreicher Publikationen. Eine Übersicht gaben RECKNAGEL und GLENDE 1973 (72).

Die selektive Hepatotoxizität von CCl_4 beruht auf dem metabolisch freigesetzten Trichlormethyl-Radikal ($\cdot\text{CCl}_3$). Seine Existenz ist kürzlich von LAI und Mitarb. bewiesen worden (79). Die Radikalbildung wird durch die NADPH-abhängige Enzymkette der mischfunktionellen Oxygenasen, die in der Zellmembran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und die bei der Metabolisierung von Arznei- und Fremdstoffen eine wichtige Rolle spielt, katalysiert. Die genaue Stelle der homolytischen Spaltung wird noch diskutiert, wahrscheinlich findet sie am Cytochrom P-450 nach irreversibler Bindung von CCl_4 an die mikrosomalen Lipide der Leberzelle statt (12,72,80). Die extrem kurzlebigen freien Radikale initiieren die Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide der ER-Membran, in die das Enzym eingebettet ist. Antioxidative Schutzmechanismen werden überwunden, die Lipidperoxidation wird autokatalytisch aufrechterhalten, schreitet rasch fort und betrifft später auch die Membranen der anderen Zellorganellen und die Zellmembran.

Cytochrom P-450 selbst wird bei diesem Prozess rasch zerstört. Die Lipidperoxidation wird als der verbindende Schritt angesehen zwischen dem CCl_4 -Metabolismus und der anschließenden durch CCl_4 ausgelösten Reaktionsfolge. Diese führt zu den typischen pathologischen Erscheinungen nach CCl_4 -Vergiftung, wie Fettinfiltration (die durch Blockade der hepatischen Triglyzeridsekretion in das Plasma zustande kommt (72)), Sinken der Membranenzymaktivitäten, Erscheinen der Leberenzyme im Plasma, Hemmung der Proteinbiosynthese und Zerstörung der mitochondrialen Zellelemente, und schließlich zum Zelltod (Nekrose). Zu einem frühen Zeitpunkt nach CCl_4 -Gabe bei Ratten sind Veränderungen am ER festzustellen. Das ER schwillt an, die Polyribosomen degranulieren, schließlich kommt es zum Zusammenbruch von Struktur und Funktion des ER infolge der fortschreitenden Lipidzerstörung, was die durch CCl_4 hervorgerufene Inhibition der Proteinbiosynthese erklärt. Dazu tragen die Peroxide bei, indem sie funktionelle Gruppen der Proteine angreifen.

(12,69,72,73,79,80,100,101)

1.3. Mechanismus der Galaktosamin-Schädigung

Die durch den Aminosucker D-Galaktosamin ausgelöste experimentelle Hepatitis bei der Ratte ähnelt der menschlichen Virus-Hepatitis nach histologischen, morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten sowohl in vivo als auch in vitro (74,76,77). Die GalN-Hepatitis wird von FODOR und Mitarb. (74) als adäquates Modell für das Screening von leberprotektiven Substanzen angesehen.

Der wichtigste Aspekt der durch GalN ausgelösten Hepatitis ist die Hemmung der Proteinsynthese und -sekretion durch akkumulierende Metaboliten von GalN, z.B. UDP-Galactosamin, die den Pool und den Metabolismus von Uracil-Nukleotiden vermindern und infolgedessen die m-RNA-Synthese hemmen. Ausser einer Hemmung der RNA-Synthese bewirkt GalN Enzyminhibition, verminderte Glycoprotein- und Glycolipidsynthese, Veränderungen am Zellkern und am Golgi-Apparat und vor allem die frühzeitig erkennbare schwere Veränderung und Schädigung der Plasmamembran, die jedoch nicht mit der Lipidperoxidation in Zusammenhang steht. Fettige Infiltration der Leber wird nach Verabreichung von GalN bei Ratten (im Gegensatz zu CCl_4) nicht beobachtet. (12,73,74,76,77,78,82,102)

2. Phalloidin-Schädigungsmodelle

Die experimentelle Vergiftung mit Phalloidin, einem der sieben bekannten Phallotoxine aus den tödlich giftigen Pilzen der Gattung Amanita (Knollenblätterpilze), wird ebenso wie CCl_4 und GalN häufig als Modell einer akuten Leberintoxikation für die Untersuchung hepatoprotektiver Substanzen in vivo und in vitro eingesetzt (85,86,123).

Phalloidin, ein zyklisches Heptapeptid mit hoher Leberspezifität, hat seinen Angriffspunkt an der Zellmembran. Durch Bindung an das kontraktile Protein Aktin der Plasmamembran verschiebt es irreversibel das Gleichgewicht zwischen dem monomeren G-Aktin und dem polymeren F-Aktin zugunsten der letztgenannten Verbindung. Infolgedessen wird die Plasmamembran der Zelle geschädigt und strukturell verändert, so daß es in vivo infolge einer Vakuolisierung der Zellen zu einer starken Leberschwellung kommt und Blut in die Zelle eindringt. In vitro zeigen isolierte Hepatozyten kurze Zeit nach der Applikation von Phalloidin infolge der strukturellen Veränderung der Zytoplasmamembran gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilte Protrusionen - plasmagefüllte Bläschen werden hervorgedrückt - was der Zelle ein korallenartiges Aussehen verleiht (85,87-89).

1978 erschien eine von WIELAND und FAULSTICH erstellte Übersicht über die biologisch aktiven Komponenten der giftigen Pilze der Gattung Amanita (89).

2.1. In vitro-Test auf Phalloidin-Antagonisierung nach RAO (91)*

Dieser Test wird wie der Screening-Test von HIKINO an isolierten Rattenhepatozyten durchgeführt (88,90).

Das Prinzip des Testes besteht darin, daß die Proben vor der Verabreichung von Phalloidin einer Suspension frisch isolierter Hepatozyten zugesetzt werden. Nach einer bestimmten Zeit werden die Zellen mit Trypanblaulösung angefärbt. Anschließend zählt man die lebenden (nicht anfärbbaren), toten (angefärbten) und schwer geschädigten, aber nicht angefärbten, also noch intakten (87), Zellen mit Bläschen (Protrusionen) an der Zelloberfläche unter dem Lichtmikroskop aus.

Ist die zugesetzte Probe hepatoprotektiv, so ist nach Gabe der Probe der Prozentsatz an geschädigten Zellen mit Phalloidin-induzierter Bläschenbildung reduziert im Vergleich zum Prozentsatz an Protrusionen nach reiner Schädigung der Hepatozyten mit Phalloidin (89,91). Als Kontrolle dienen Hepatozytensuspensionen, denen nur das Lösungsmittel zugesetzt wurde.

Der Prozentsatz an geschädigten Zellen wird berechnet nach der Formel:

$$\frac{\text{Zahl der Zellen mit Bläschen} \times 100}{\text{Zahl der nicht anfärbbaren Zellen}} - \% \text{ der Zellen mit Bläschen bei der Kontrolle}$$

Das Ausmaß des Zellschutzes durch die Proben gegen die Bildung von Protrusionen durch Phalloidin wird ermittelt nach der Formel:

$$100 - \frac{\text{Prozent geschädigte Zellen nach Vorbehandlung} \times 100}{\text{Prozent geschädigte Zellen nach reiner Phalloidingabe}}$$

* Wir danken Prof. G. RAO, Institut für klinische Biochemie, Bonn, für die Durchführung der Tests

Dieser Test wurde nur für solche Substanzen durchgeführt, die sich bereits im Screening-Test (s. S. 15) gegenüber der CCl_4 - und der GalN-induzierten Zytotoxizität als stark wirksam erwiesen hatten.

2.2. In vivo-Test an der phalloidinvergifteten Maus (92)*

Bei diesem in vivo-Test verabreicht man die Proben in verschiedenen Konzentrationen i.v. je 10 Mäusen pro Kollektiv, jeweils eine Stunde vor der i.p. Verabreichung von Phalloidin, also ebenfalls protektiv. Die Tiere werden sieben Tage lang beobachtet. Die Todesrate innerhalb des Beobachtungszeitraumes wird ermittelt und in Prozent der Gruppentierzahl umgerechnet. Nebenwirkungen der verabreichten Substanzen werden gleichzeitig registriert.

Hepatoprotektive Wirkung der verabreichten Proben äußert sich in einer verringerten Todesrate gegenüber dem Kollektiv, dem nur Phalloidin ohne vorherigen Schutz appliziert wurde.

Aufgrund der großen Substanzmenge, die für die Durchführung des Versuches benötigt wird (ca. 100 mg), konnten in diesem Testmodell bisher nur Extrakte und Fraktionen und keine Reinsubstanzen getestet werden.

3. Test auf Stimulierung der RNA-Synthese an Rattenleberzellkernen nach SONNENBICHLER (94)**

Das in dieser Arbeit eingesetzte Testsystem mit isolierten Zellkernen aus Rattenleber ist eine der Methoden, die von SONNENBICHLER und Mitarb. zur Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus von Silybin entwickelt wurden (93-97). Es wird der Einfluß von Substanzen auf die RNA-Synthese in den Zellkernen in vitro bestimmt. Dabei gibt die zeitabhängige

* Wir danken Herrn Dr. K.P. Odenthal, Fa. Madaus & Co., Köln, für die Durchführung der Versuche

** Wir danken Herrn Prof. J. Sonnenbichler, MPI Martinsried b. München, für die Durchführung der Tests

Messung der Einbaurate von Tritium-markiertem UTP in säure-präzipitierbares Material Aufschluß über die RNA-Synthese in den Zellkernen. Die RNA-Synthese wird über einen Zeitraum von 15 min verfolgt, wobei die Einbaurate von ^3H -UTP durch Messung der Radioaktivität des säurepräzipitierbaren Materials nach 2, 5, 10 und 15 min bestimmt wird. Eine gegenüber den Kontrollen höhere Einbaurate von ^3H -UTP in die RNA der Zellkerne nach Zugabe der Proben bedeutet eine Stimulierung der RNA-Synthese. Eine gesteigerte RNA-Synthese führt zu vermehrter Proteinbiosynthese, so daß dieser in vitro-Test erste Hinweise auf Substanzen liefert, die eine Beschleunigung der Leberzellregeneration bewirken und Leberschäden durch Ersatz zerstörter Zellproteine aufheben könnten (5,97).

Wegen des sehr aufwendigen und kostspieligen Verfahrens wurden nur Fraktionen und Reinsubstanzen getestet, die sich in anderen Testmodellen als wirksam erwiesen hatten. Als Screening-Methode ist dieser Test nicht geeignet.

KAPITEL 3:

PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON BUTEA MONOSPERMA-BLÜTEN

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Systematik und Verbreitung

Butea monosperma (Lam.) Taub. (Synonyme: *Butea frondosa* Koen. ex Roxb. und *Erythrina monosperma* Lam.) gehört zur Familie der Leguminosae (Fabaceae).

Die Leguminosae sind eine der drei größten Familien blühender Pflanzen mit über 12 000 Arten (105). Es herrscht keine allgemeine Einigkeit über die systematische Einteilung dieser Familie. ENGLER (106) teilt die Leguminosae ein in drei Unterfamilien: Mimosoideae, Caesalpinioideae und Faboideae (=Papilionaceae, =Papilionatae, =Lotoideae).

Nach ENGLER (106) wird die Gattung *Butea* der Unterfamilie Faboideae, dem Tribus Phaseoleae und dem Subtribus Erythrininae zugeordnet.

Butea monosperma ist eine der sieben Arten der Gattung *Butea* Koen. ex Roxb.

Alle Vertreter der Gattung *Butea* sind im tropischen Asien heimisch. *Butea monosperma* ist in den gebirgigen Gegenden von Vorder- und Hinterindien beheimatet. Außerdem wächst sie in Ceylon, Burma und Malaysia und wird in anderen Teilen der Tropen kultiviert.

In der Literatur findet man folgende volkssprachliche Namen für *Butea monosperma*:

Palasha, Pulasha, Palas-tree, Kwao-kua, Dhak, Gul-e-teesu, Bastard Teak, Flame of the Forest, Ploso abang, Khakara.

Im Deutschen heißt *Butea monosperma* auch Ostindischer Palassa- oder Plossabaum und Malabrischer Lackbaum.

Literatur zu 1.1. findet man bei (16,23,27,107,108,247).

1.2. Botanische Beschreibung

Butea monosperma ist ein kleiner bis mittelgroßer, 6 bis 16 m hoher Baum, der im März und April blüht. Der Stamm ist meist krumm und von einer aschgrauen, dicken, schwammigen Rinde bedeckt. Nach Einschnitt tritt aus dem Stamm ein rotes Harz aus, das zu einer brüchigen, dunkelroten, adstringierenden Masse erhärtet (*Butea*- "gum" oder Palasa- bzw. Bengalisches Kino) (108,136,171).

Die Einzelbättchen der dreiteiligen, alternierend stehenden, 20 bis 40 cm langen Fiederblätter sind 10 bis 15 cm lang und 7,5 bis 12 cm breit, ledrig, starr, ganzrandig, auf der Oberseite glatt und glänzend und unten seidig behaart mit vielen Gefäßen. Das endständige Blättchen ist eiförmig und größer als die beiden schräg eiförmigen Seitenblättchen.

An den meist blattlosen, irregulär in verschiedene Richtungen gebogenen Zweigen sitzen zahlreiche starre, hängende traubenförmige Blütenstände, je drei an einem angeschwollenen Knoten, mit sehr großen, auffälligen, tiefroten oder orangefarbenen, gestielten Blüten. An der Spitze der gestielten, länglichen, flaumig behaarten, 15 cm langen Hülsenfrucht sitzt nur jeweils ein Samen, der nierenförmig, flach, 25 bis 38 mm lang, 16 bis 25 mm breit und 2 mm dick ist und eine dunkelrotbraune, glänzende, glatte Samenschale besitzt (108).

Eine Habituszeichnung (A) sowie Detailzeichnungen der Blüten (B,C), Frucht (D) und Samen (E) zeigt Abbildung 2 (136).

1.3. Volksmedizinische Verwendung

Die Blätter von *Butea monosperma* werden in Indien volksmedizinisch als Aphrodisiakum und Tonikum verwendet (16,23).

Das Harz wird dort als ausgezeichnetes Adstringens bei Diarrhoe und Dysenterie geschätzt (16,23).

Die Samen werden in der Ayurvedischen Medizin (196) innerlich und äußerlich als Antihelminthikum sowie als Laxans angewandt und auch gegen Herpes eingesetzt (16,23). Die noch in der Indischen Pharmakopöe von 1955 aufgenommenen *Butea monosperma*-Samen erwiesen sich jedoch bei einer späteren Toxizitätsstudie

u.a. als stark nephrotoxisch (169).

Die Knollen sollen östrogene Aktivität besitzen (112).

Die Blüten sollen adstringierende, diuretische, depurative, aphrodisierende, tonisierende, entzündungshemmende, antipyretische und appetitanregende Wirkungen haben. Sie werden auch bei Dysmenorrhoe und gegen Schwellungen angewandt (16,23,27). Außerdem benützt man in Indien die Blüten zum Gelbfärben u.a. von Speisen (107).

Ferner werden die Blüten von *Butea monosperma* bei Virushepatitis und zur Behandlung anderer Leberstörungen eingesetzt (27).



Nach Roxburgh.

Abb. 2

BUTEA MONOSPERMA (LAM.) TAUB.

Habituszeichnung aus "Atlas der Baumarten von Java" (136)

- A: Habitusbild (1/3*)
- B: Blüte von vorne und von der Seite (1/1*)
- C: Blütenanalyse (1/1*)
- D: Frucht (1/3*)
- E: Samen (1/1*)

(* bezieht sich auf DIN A4)

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Die Samen enthalten neben gesättigten und ungesättigten Fettsäuren das n-Heneicosäure- δ -lacton, das antihelminthische Prinzip Palasonin, das Imidazolalkaloid Monospermin (117-119) und ein Lektin (120).

Proanthocyanidine wurden in der Rinde und im Harz gefunden (109,116).

Aus den Blüten des Palasabaums wurden eine Vielzahl flavonoider Verbindungen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt (Tabelle 3) (107,109-111,113,115); außerdem wurde β -Sitosterol nachgewiesen (114).

Tabelle 3: Bekannte Flavonoide aus den Blüten von *Butea monosperma*

Verbindung		Struktur
1. <u>FLAVANONE</u>		
Butin	$R=R'=H$	
Isocoreopsin	$R=Glc, R'=H$	
Isomonospermosid	$R=H, R'=Glc$	
Butrin	$R=R'=Glc$	
2. <u>CHALKONE</u>		
Butein	$R=R'=H$	
Coreopsin	$R=Glc, R'=H$	
Monospermosid	$R=H, R'=Glc$	
Isobutrin	$R=R'=Glc$	
3. <u>AURONE</u>		
Sulphurein	$R=Glc, R'=H$	
Palasitrin	$R=R'=Glc$	

1.5. Bisherige pharmakologische Untersuchungen

Bei einem großangelegten Screening-Programm indischer Pflanzen auf biologische Aktivität, das mit wäßrig-alkoholischen Extrakten durchgeführt wurde, zeigte der Extrakt aus getrockneten Blüten von *Butea monosperma* in den durchgeführten Tests keine pharmakologische Aktivität (u.a. Wirkung auf verschiedene Mikroorganismen, Einfluß auf Blutdruck und ZNS). Die ermittelte LD₅₀ lag über 1000 mg/kg (i.p. bei Mäusen) (121).

Ein wäßriger Extrakt aus den Blüten war in vivo antiinflammatorisch wirksam (122).

Bei einer Studie über die Wirkung von *Butea monosperma* auf die Leber fanden NAZIMUDDIN und Mitarb. (27), daß ein wäßriger Auszug aus den Blüten Albino-Ratten in vivo vor CCl₄-induzierten Leberschäden schützte und daß die Leberregeneration bei teilhepatektomierten Ratten nach Gabe des Extraktes signifikant erhöht wurde. Aktive Prinzipien des wäßrigen Extraktes wurden jedoch nicht identifiziert.

Der leberprotektive Effekt des Extraktes gegen CCl₄-induzierte Schäden wurde durch Bestimmung der Schlafdauer nach Pentobarbital-Verabreichung gemessen. Dabei wurde durch protektive Verabreichung des Extraktes (8 Tage lang 333 mg/150 g, p.o.) die nach Leberschädigung mit CCl₄ beobachtete verlängerte Schlafdauer wieder verkürzt (Vergleich mit je einer Gruppe, der Lösungsmittel bzw. nur CCl₄ verabreicht wurde). Histopathologische Befunde sowie erniedrigte Serumbilirubin- und Serumenzymspiegel (GPT und alkalische Phosphatase) bestätigten das Ergebnis einer Schutzwirkung. Der leberregenerationsfördernde Effekt wurde bestimmt nach Verabreichung des Extraktes an teilhepatektomierte Ratten (333 mg/100 g, p.o.) und Messung der Lebergewichte in Relation zum Körpergewicht im Vergleich zu Kontrollgruppen nach verschiedenen Zeiten.

Ein 1983 von FIEBIG (6) in unserem Arbeitskreis durchgeführtes Drogenscreening führte zu folgendem Resultat:

Die Ergebnisse von zwei in vitro-Tests (Hepatozyten-Test nach HIKINO (s. Kap. 2) und Test mit isolierter Polymerase A nach SONNENBICHLER (94)) zeigten, daß das Wirkprinzip der Droge sehr wahrscheinlich in der polaren Flavonoid-Fraktion (Butanol-Fraktion) zu suchen war.

2. Phytochemische Untersuchungen

2.1. Pharmakologisches Screening und DC-Untersuchungen

Für unsere Untersuchungen standen uns ein Methanol-Gesamtextrakt, eine Ethylacetat- und eine Butanol-Fraktion zur Verfügung. Diese Extrakte waren in unserem Institut durch Soxhlet-Extraktion der Blüten von *Butea monosperma* mit Methanol und anschließendes sukzessives Ausschütteln mit EtOAc und n-BuOH hergestellt worden (6).

Der Gesamtextrakt und die EtOAc-Fraktion wurden zunächst im Hepatozyten-Test von HIKINO getestet, um die Ergebnisse mit den von FIEBIG für die BuOH-Fraktion erhaltenen zu vergleichen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Antihepatotoxische Aktivität der Extrakte aus *Butea monosperma*-Blüten gegen CCl_4 - und GalN-induzierte Zytotoxizität in Rattenhepatozyten

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100±1	100±2
MeOH-Gesamtextrakt	1,0	97±1	68±2*
EtOAc-Fraktion	1,0	89±1	67±1*
BuOH-Fraktion (6)	1,0	54±4*	62±0*

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, wirksam, $p < 0,001^*$, $n = 3$ (58,59)

Die Schutzwirkung der BuOH-Fraktion gegen CCl_4 -Hepatotoxizität war größer als die des Gesamtextraktes und der EtOAc-Fraktion. Im Versuch mit GalN als toxischem Agens waren die Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den drei Extrakten geringer. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Ergebnissen von FIEBIG, d.h. das Wirkprinzip mußte in der BuOH-Fraktion lokalisiert sein.

Ein DC-Vergleich des MeOH-Gesamtextraktes mit der EtOAc- und der BuOH-Fraktion erfolgte im allgemeinen Laufmittel für Flavonoidglykoside (125) (Abb. 3).

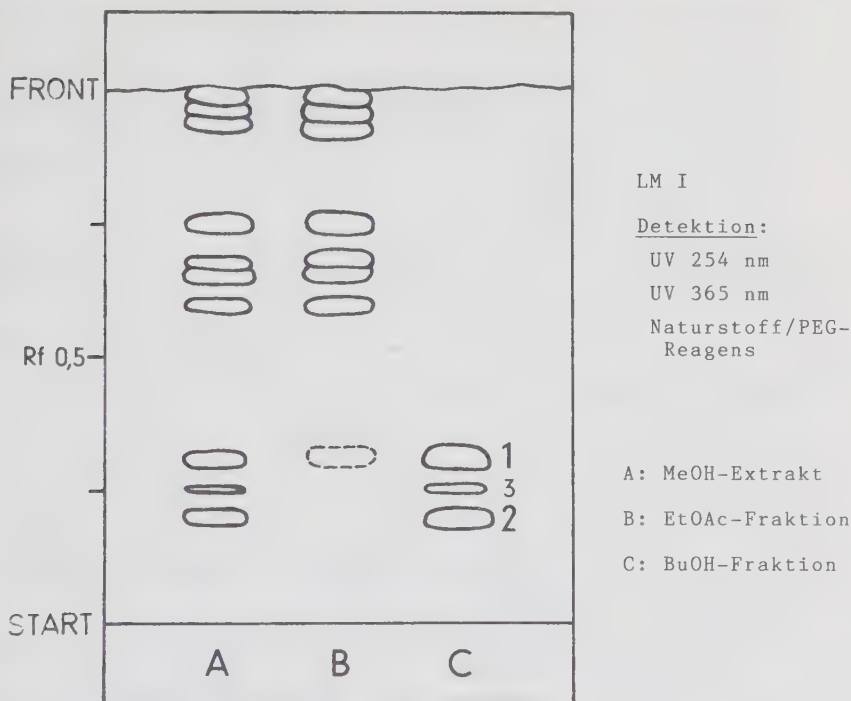


Abb. 3: DC-Vergleich des MeOH-Extraktes mit der EtOAc- und der BuOH-Fraktion aus den Blüten von *Butea monosperma*

Im DC-Bild des MeOH-Extraktes waren mindestens 11 flavonoide Verbindungen nachweisbar. In der EtOAc-Ausschüttelung befanden sich die lipophilen Flavonoide (oberer und mittlerer Rf-Bereich). Die BuOH-Fraktion enthielt nur die hydrophilen Flavonoide (unterer Rf-Bereich). Die obere der beiden stark flu-

oreszenzmindernden Hauptzonen der BuOH-Fraktion (1, Abb. 3) war nur in Spuren in der EtOAc-Fraktion nachzuweisen. Durch die sukzessive Ausschüttelung war eine nahezu quantitative Trennung der lipophilen und hydrophilen Flavonoide erfolgt.

In der BuOH-Fraktion waren im LM I zwei homogen erscheinende Hauptzonen nachzuweisen, die nach absteigendem Rf-Wert mit Flavonoid 1 und Flavonoid 2 bezeichnet wurden. Dazwischen war eine Spur einer dritten Substanz ("Flavonoid" 3) detektierbar.

Nach dem Laufverhalten der beiden Flavonoide 1 und 2 handelte es sich um Diglykoside.

Das Detektionsverhalten der Flavonoide 1 und 2 ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 5: Detektionsverhalten von Flavonoid 1 und 2

		Flavonoid 1	Flavonoid 2
vis		gelb	-
UV 254 nm		Fluoreszenz-Mind.	Fluoreszenz-Mind.
UV 365 nm		braun	-
NST/PEG vis		orange, dann tiefviolett	zuerst keine Reaktion, später* gelb
	UV	orange	"
FeCl ₃	vis	olivgrün	zuerst keine Reaktion, später* grünbraun
NH ₃	vis	tieforange	gelb

* erst nach etwa einwöchigem Liegenlassen der DC-Platten

Damit war noch nicht gesichert, ob es sich bei "Flavonoid 2" auch tatsächlich um ein solches handelte, da Flavonoide normalerweise Eigenfluoreszenz im UV 365 nm zeigen, die nach Besprühen mit NST/PEG-Reagens verstärkt wird (125).

"Flavonoid" 3 hatte eine gelbgrüne Eigenfluoreszenz, reagierte jedoch nicht mit den angegebenen Sprühreagentien.

Weitere Auftrennversuche der Flavonoide 1 und 2 erfolgten durch Reversed-Phase-Dünnschichtchromatographie auf RP18-Fertigplatten (Abb. 4).

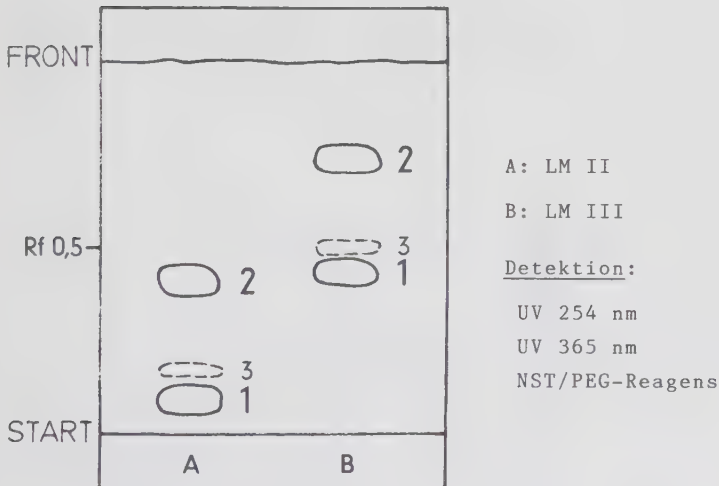


Abb. 4: DC der BuOH-Fraktion auf RP18-Schichten

Auch in der RP18-DC erfolgte keine weitere Auftrennung der Zonen von Flavonoid 1 und 2. Damit sollten dünn-schichtchromatographisch reine Zonen vorliegen.

2.2. Isolierung von Flavonoid 1 und Flavonoid 2

2.2.1. Präparative HPLC

Zur Isolierung sollte die HPLC mit Reversed-Phase-Material als stationärer Phase eingesetzt werden, die bereits 1975 von WULF und NAGEL (124) und 1978 von TITTEL (170) mit Erfolg zur Trennung von Flavonoiden verwendet worden war.

Im analytischen Maßstab gelang eine gute Grundlinientrennung der BuOH-Fraktion mit einer μ -Bondapak[®] C18-Säule und 30%igem Methanol bei isokratischem Betrieb, wobei zwei Hauptpeaks erschienen. Kürzere Retentionszeiten bei gleich guter Grundlinientrennung erhielten wir mit TS I (35% MeOH). Die beiden Hauptpeaks wurden in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Detektor mit Peak A ($R_t = 2,6$ min) und Peak B ($R_t = 9$ min) bezeichnet. Der kleine Peak erhielt die Bezeichnung C ($R_t = 6,3$ min) (Abb. 5).

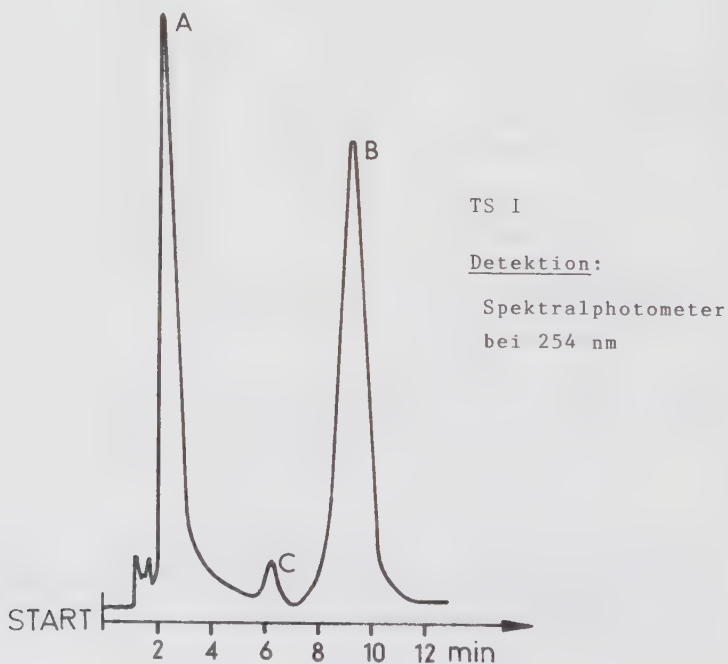


Abb. 5: Analytische HPLC-Trennung der BuOH-Fraktion

Zur Übertragung in den semi-präparativen Maßstab war dieses Trennsystem auch geeignet, da bei isokratischem Betrieb gearbeitet wurde, die Grundlinientrennung trotz des Peak-Tailings nicht beeinträchtigt war und das Fließmittel keine Säure enthielt.

Wegen der größeren Belastbarkeit wählten wir für die Isolierung von A und B eine semi-präparative RP18-Trennsäule von 30 cm Länge und 7,9 mm Durchmesser (μ -Bondapak[®]C18). Das TS I der analytischen HPLC mußte jedoch leicht modifiziert werden, um zu lange Laufzeiten pro Durchgang zu vermeiden (TS II).

In insgesamt 70 Durchgängen trennten wir in TS II 63,8 mg der Substanz aus der BuOH-Ausschüttelung auf. Pro Durchlauf konnten unter den gewählten Bedingungen maximal 960 μ g der Substanz eingespritzt und in 38 min chromatographiert werden. Fraktioniert wurde nach dem Detektorsignal bei 254 nm (s. Abb. 6).

Die aufgefundenen Fraktionen wurden zur Entfernung des Methanolanteils auf etwa 60% eingeeengt und die verbleibende wäßrige Phase gefriergetrocknet. Wir erhielten 15,7 mg Substanz A als hellgelbes Pulver und 21,6 mg Substanz B als orangerotes Pulver, die uns für die Strukturaufklärung und die pharmakologischen Untersuchungen zur Verfügung standen. Von Substanz C konnte nur etwa 1 mg erhalten werden, so daß wir diese Verbindung zunächst nur dünnschichtchromatographisch untersuchen und zuordnen konnten (Abb. 6).

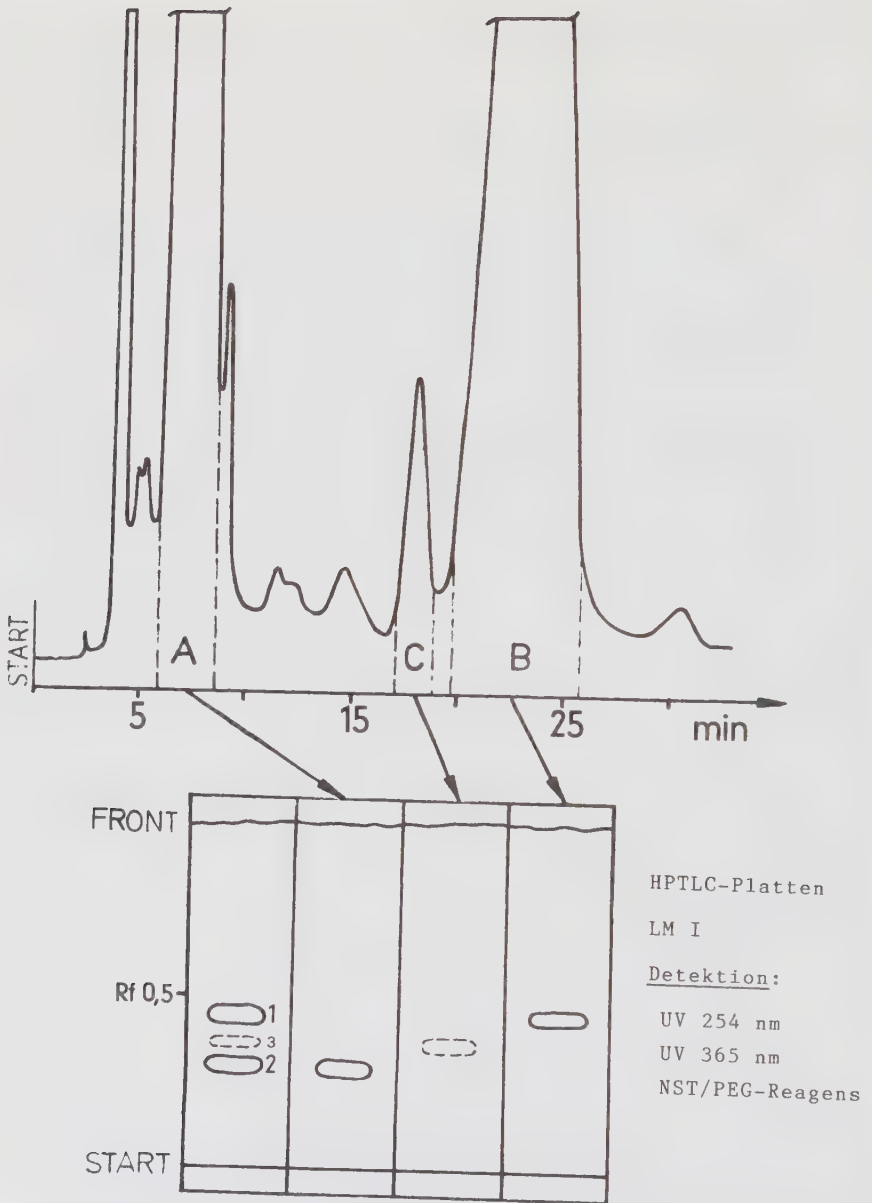


Abb. 6: Semi-präparative HPLC-Trennung der BuOH-Fraktion und DC der Fraktionen (TS II, s. Exp. Teil IV. 1.4.1.)

Verbindung A war Flavonoid 2 zuzuordnen und Substanz B mit der längeren Verweildauer auf der HPLC-Säule entsprach Flavonoid 1. Substanz C war die DC-Zone 3 (s. Abb. 6).

Die isolierten Substanzen erwiesen sich auch auf DC- und HPTLC-Platten sowie in der analytischen HPLC (TS I) als chromatographisch rein.

2.2.2. Präparative DC

Als zweite Isolierungsmethode verwendeten wir die wesentlich schneller durchzuführende präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel-Fertigplatten mit einer Schichtdicke von 0,5 mm.

Nach mindestens viermaliger Vorentwicklung der Platten mit Methanol (s. Exp. Teil) zur Entfernung der Kleberanteile konnten nach präparativer DC mit LM I und anschließender Filtration durch eine SepPak®-Kartusche (RP18-Material) und Membranfiltration aus 31 mg BuOH-Fraktion 9 mg Flavonoid 1 und 4,4 mg Flavonoid 2 in reiner Form gewonnen werden (die SepPak-Filtration diente zur Entfernung hydrophiler Verunreinigungen (Reste vom Kleber)). Dies entsprach einer Ausbeute von etwa 29 bzw. 14% der eingesetzten Fraktion. Damit war die Ausbeute an chromatographisch reinem Flavonoid 1 bzw. 2 geringer als nach semi-präparativer HPLC (34 und 25% der eingesetzten Fraktion).

2.3. Strukturaufklärung

2.3.1. Flavonoid 1

Der Farbstest nach SHINODA (126) und das UV-Spektrum von Flavonoid 1 mit dem Hauptmaximum (Bande I) bei 375 nm ließen auf das Vorliegen eines Chalkons schließen. Die Struktur eines Aurons ließ sich ausschließen, da Bande I im UV-Spektrum natürlich vorkommender Aurone nach MABRY und Mitarb. bei höheren Wellenlängen liegt (388-412 nm) (127).

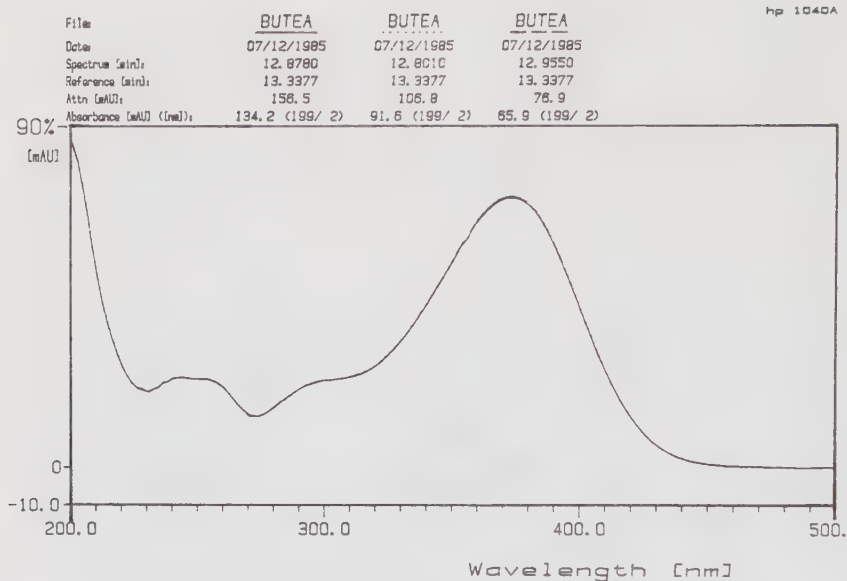


Abb. 7: Bei der HPLC-Trennung on-line aufgenommenes UV-Spektrum von Flavonoid 1

Tabelle 6: Bathochrome Verschiebungen von Bande I von Flavonoid 1

MeOH	NaOAc	NaOMe	AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl
375	445 (70)(+)	445 (70)(+)	435 (60)(+)	423 (48)(-)*

* Die angegebenen Zahlen bedeuten Lage von Bande I bzw. Differenzwert zum MeOH-Spektrum in nm; (+)=Hyperchromie, (-)=Hypochromie von Bande I

Die bathochrome Verschiebung von Bande I mit Natriumacetat um 70 nm ließ auf eine 4' und/oder 4-OH-Substitution des Chalkongerüsts schließen (s. Tab. 6). Die Bathochromie mit Natrium-methylat um ebenfalls 70 nm unter Intensitätszunahme zeigte an, daß in der Position 4 eine freie Hydroxygruppe vorhanden war.

Bei einer 4'-OH-Substitution würde sich mit NaOMe zwar dieselbe bathochrome Verschiebung, jedoch keine Hyperchromie ergeben.

Mit Aluminiumchlorid und Salzsäure entstand eine Bathochromie von 48 nm, so daß eine OH-Gruppe in der Position 2' vorhanden sein mußte. Eine ortho-ständige Dihydroxygruppe am Ring B konnte ausgeschlossen werden, da sonst die bathochrome Verschiebung mit AlCl_3 um 40 bis 70 nm über der mit AlCl_3/HCl liegen müßte. Bei dem Chalkon betrug diese Differenz nur 12 nm (127,128).

Bei Flavonoid 1 konnte es sich damit nicht um Coreopsin handeln (Formel s. S. 26).

Nach diesen Ergebnissen lag ein Chalkon mit freien OH-Gruppen in 2' und 4-Stellung wie z.B. bei Isobutrin oder Monospermosid vor.

2.3.1.1. FAB-MS

Zur Klärung der Isobutrin-(Diglucosid) bzw. Monospermosid-(Monoglucosid)-Struktur verwendeten wir die von BARBER und Mitarb. (130,134) entwickelte Fast-Atom-Bombardment-Massenspektroskopie (FAB-MS). Die FAB-MS hat vor allem bei der Analyse kleiner Mengen polarer organischer Substanzen wie z.B. Oligosaccharide, Peptide, organische Salze oder Glykoside (130, 131,133) den Vorteil, daß nicht derivatisiert werden muß.

Informationen über das Molekulargewicht erhält man durch die Pseudomolekütionen vom Typ $(\text{M}+\text{H})^+$ bei Positivionendetektion bzw. $(\text{M}-\text{H})^-$ bei Negativionendetektion.

Nachteile sind das starke Grundrauschen, das von Matrixfragmenten stammt und das Erkennen von Probensignalen erschwert, sowie das Auftreten von z.T. ausgeprägten Signalen, die von Matrixmolekülaggregaten (bei Glycerin: $(92n \pm \text{H})^\pm$) oder Aggregaten von Probenmolekülen mit der Matrix $(\text{M}+(\text{Matrix})_n \pm \text{H})^\pm$ herühren (130-134).

Das FAB-MS von Flavonoid 1 zeigt Abb. 8 (Negativionen-Detektion).

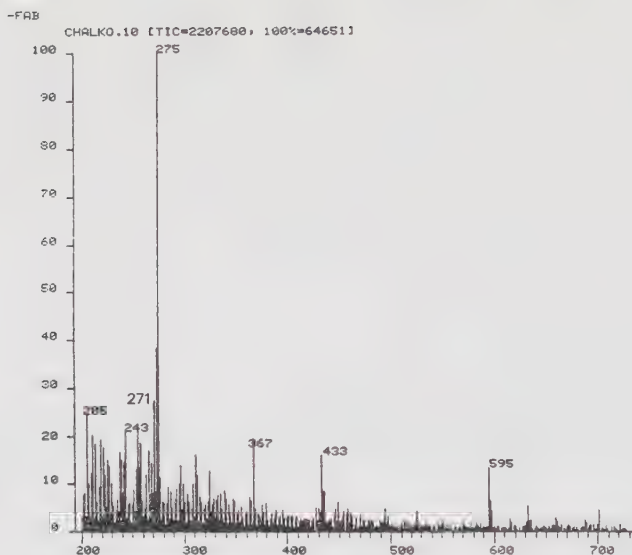


Abb. 8: Negatives FAB-MS von Flavonoid 1

Wir erhielten das $(M-H)^-$ Pseudomolekülion bei m/z 595, so daß das Molekulargewicht der Substanz 596 war. Ging man vom unsubstituierten Chalkongerüst mit einer Masse von 208 aus, so blieben 388 Masseneinheiten für die Substituenten übrig. Die Fragmente bei m/z 433 und 271 zeigten die Abspaltung zweier Hexosen an. Das Aglykon hatte folglich eine Masse von 272. Die Peaks bei m/z 367 und 275 stammten von der Matrix $((Glyc_4-H)^-$ und $(Glyc_3-H)^-$).

Lagen die beiden Hexosen als O-Glykoside vor, so verblieben noch 32 Masseneinheiten für weitere Substituenten. Dies entsprach der Masse zweier Hydroxygruppen (vgl. S. 37).

Der Peak bei m/z 243 könnte von einem Fragment des Aglykons ($(M-H)^- = 271$) stammen, bei dem CO (28 Masseneinheiten) abgespalten wurde.

Nach dem FAB-MS war Flavonoid 1 ein 2',4-Dihydroxychalkon, das zusätzlich zwei glykosidische OH-Gruppen haben mußte.

2.3.1.2. Mikrohydrolyse

Die auf der DC-Platte durchgeführte Mikrohydrolyse nach KARTNIG (137) lieferte nach Entwicklung der Platten in LM IV und Detektion mit dem Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagens als Zuckerkomponente nur Glucose (Abb. 9).

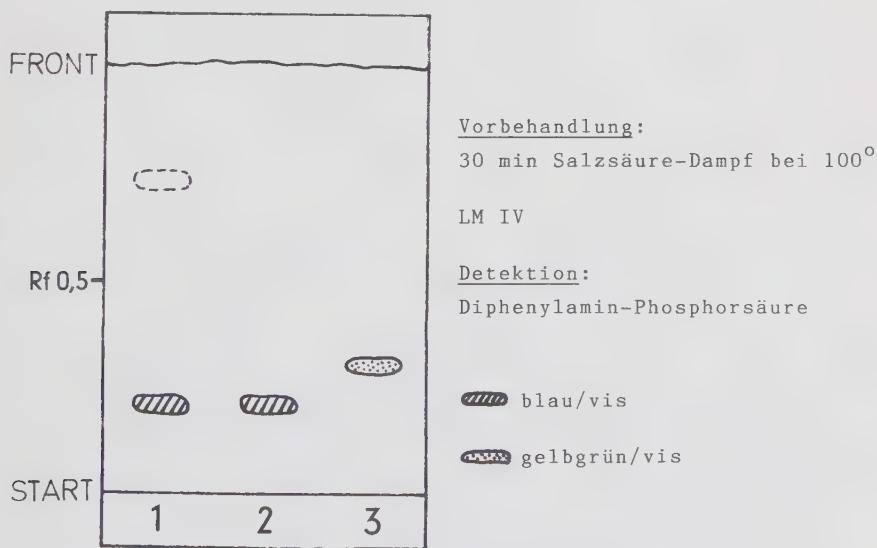


Abb. 9: Nachweis von Glucose nach Mikrohydrolyse von Flavonoid 1

- 1: Flavonoid 1 nach Mikrohydrolyse
- 2: D-Glucose (vor und nach Mikrohydrolyse)
- 3: Flavonoid 1 unhydrolysiert

Nach diesen Ergebnissen (FAB-MS und Mikrohydrolyse) sollte es sich bei Flavonoid 1 um Isobutrin und nicht um Monospermosid (s. S. 26) handeln. Da die Schmelzpunkte beider Flavonoide nahezu identisch sind (Isobutrin: 192-193°, Monospermosid: 194-195° (113)), nahmen wir noch ein ^1H -NMR-Spektrum auf.

2.3.1.3. ^1H -NMR

Den Aromatenbereich des bei 80 MHz in DMSO-d_6 aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrums von Flavonoid 1 zeigt Abb. 10 (s. auch Tab. 7).

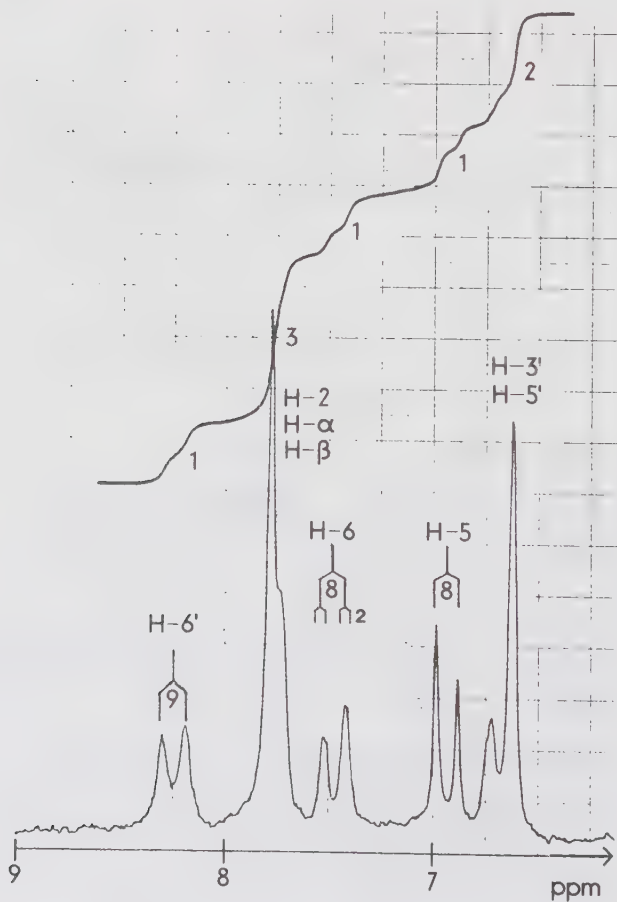


Abb. 10: ^1H -NMR-Spektrum von Flavonoid 1 (Ausschnitt)

Tabelle 7: ^1H -NMR von Flavonoid 1

Signal (ppm)	Spinzustand	Integration	Zuordnung (127,138)
ca. 3,5	Multiplett	12 H	Zuckerprotonen von 2 Glucosen
4,9	"	1 H	C-1"-H Glucose
5,1	"	1 H	C-1"-H Glucose
6,67	"	2 H	H-3', H-5'
6,93	Dublett J = 8 Hz	1 H	H-5
7,48	Dublett-Dublett J = 8 und 2 Hz	1 H	H-6
ca. 7,78	Multiplett (breites Signal)	3 H	H-2, H- α , H- β
8,25	Dublett J = 9 Hz	1 H	H-6'

Im Bereich der Zuckerprotonen bestätigte die Integration, daß eine Substitution mit zwei Hexosen vorliegen mußte.

Das Resonanzsignal des A-Ring-Protons H-6' bei 8,25 ppm erschien als Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 9 Hz. H-6' koppelte also mit dem Nachbarproton H-5'. Eine Kopplung mit einem eventuell meta-ständigen H-4' konnte ausgeschlossen werden. Die Signalgruppe bei 6,67 ppm stammte von den überlagerten Resonanzen von H-3' und H-5'. In dem Signal war nur eine ortho-Kopplung des H-5' zu erkennen. Eine Aufspaltung der H-5'-Resonanz in ein Dublett-Dublett war nicht erfolgt. Danach mußte die Position 4' substituiert sein.

Bei den B-Ring-Protonen wurde die H-3- bzw. H-5-Resonanz bei 6,93 ppm als scharfes Dublett mit J = 8 Hz registriert. Da die Position 4 mit einer freien OH-Gruppe substituiert ist, muß dieses Proton mit dem ortho-ständigen H-2 bzw. H-6 koppeln. Dieses Nachbarproton erschien bei 7,48 ppm als Dublett-Dublett mit J = 8 und 2 Hz. Damit koppelt es auch mit einem meta-ständigen Proton. Also war der Ring B des Chalkons am C-3 substitu-

iert und die Resonanzsignale bei 6,93 und 7,48 ppm stammten folglich vom H-5 und H-6.

Nach dem NMR-Spektrum mußte das Chalkon also außer zwei Hydroxygruppen am C-4 und C-2' zwei weitere Substituenten am C-3 und C-4' tragen. Nach den bisherigen Ergebnissen mußte es sich um eine Substitution mit jeweils einer O-glykosidisch gebundenen Glucose handeln.

Damit war Flavonoid 1 2',3,4,4'-Tetrahydroxy-chalkon-3,4'-di-O-glucosid und identisch mit Isobutrin (Abb. 11).

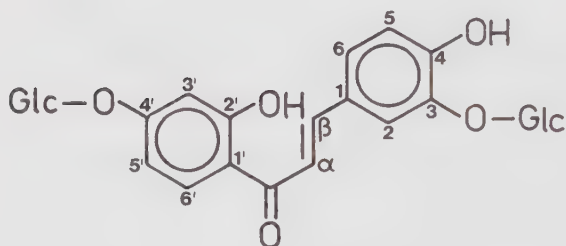


Abb. 11: Struktur von Flavonoid 1 (Isobutrin)

2.3.2. Flavonoid 2

Nach den Farbreaktionen nach SHINODA und PEW (126) sowie dem UV-Spektrum mit dem Hauptmaximum bei 271 nm (Bande II) und einem zweiten hypochromen Maximum bei 315 nm (Bande I) (Abb. 12) sollte Flavonoid 2 ein Flavanon sein.

Weder mit NaOAc noch mit NaOMe trat eine bathochrome Verschiebung von Bande II ein. Damit konnte eine freie OH-Gruppe in den Positionen 5 und 7 des Flavanons ausgeschlossen werden. Auch die fehlende Bathochromie mit AlCl_3 und HCl bewies, daß keine C-5-OH-Gruppe vorliegen konnte (127,128). Flavonoid 2 war also nicht mit Isomonospermosid identisch (Formel s. S. 26).

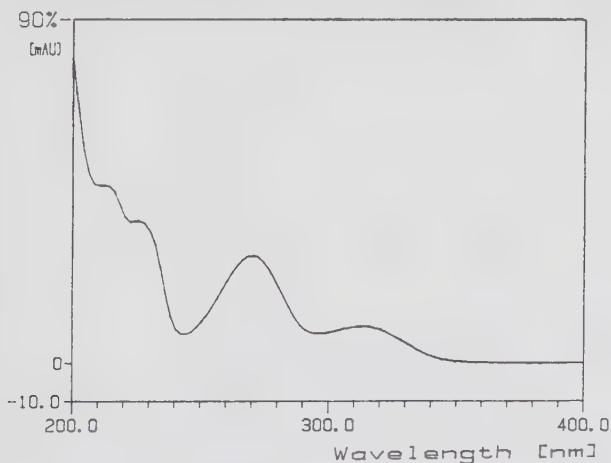


Abb. 12: On-line registriertes UV-Spektrum von Flavonoid 2

Im IR-Spektrum (Abb. 13) lag die Carbonyl-Absorptionsbande bei 1660 cm^{-1} , also bei höheren Wellenzahlen als bei Isobutrin (1635 cm^{-1}).

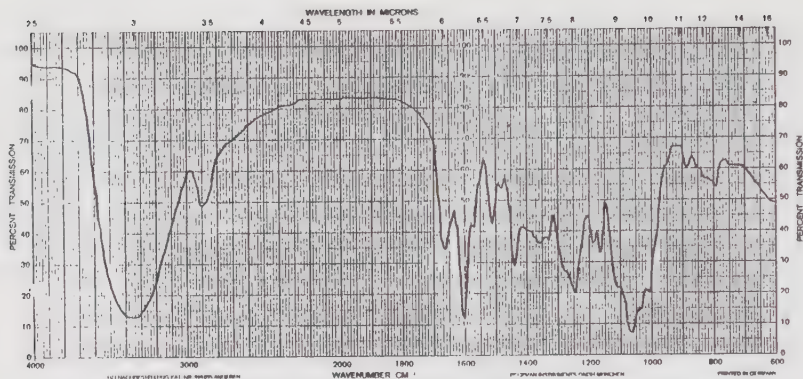


Abb. 13: IR-Spektrum von Flavonoid 2

Im FAB-MS negativer Ionen traten dieselben Fragmente auf wie bei dem Chalkon Isobutrin (Tabelle 8):

Tabelle 8: Charakteristische Fragmente im FAB-MS von Flavonoid 2 (Negativionen-Detektion)

m/z	Zuordnung
595	$(M-H)^-$
433	$(M-H)^- - 162$ (Abspaltung einer Hexose)
271	$(M-H)^- - 162 - 162$ (Abspaltung einer zweiten Hexose) $\hat{=}$ (Aglykon-H) $^-$
255	$(Aglykon-O-H)^- \quad ?$

Das $(M-H)^+$ Pseudomolekülion wurde bei m/z 595 registriert. Das Molekulargewicht von Flavonoid 2 war somit gleich dem von Isobutrin (596). Der unsubstituierte Flavanon-Grundkörper hat eine Masse von 224. Da nach Mikrohydrolyse mit HCl wie bei Isobutrin als Zuckerbestandteil nur D-Glucose nachweisbar war, mußte Flavonoid 2 ebenfalls zwei O-glykosidisch gebundene Glucosen tragen. Damit waren noch 16 Masseneinheiten auf weitere Substituenten zu verteilen, entsprechend einer freien OH-Gruppe. Bei Flavonoid 2 konnte es sich also nur um Butrin handeln.

Für das 80 MHz 1H -NMR-Spektrum verwendeten wir die durch präparative DC isolierte Substanz.

Tabelle 9: 1H -NMR von Flavonoid 2

Signal (ppm)	Spinzustand	Integration	Zuordnung (127,128,138)
ca. 2,85	Multipllett	2 H	H ₂ -3
ca. 3,5	komplexes Multipllett	12 H	Zuckerprotonen von 2 Glucosen
4,77	Multipllett	1 H	C-1"-H Glucose
5,05	"	1 H	C-1"-H Glucose
5,5	Quartett J ₁ = 12, J ₂ = 4 Hz	1 H	H-2
6,75	überlagerte Dubletts	2 H	H-6, H-8
ca. 7	komplexes Multipllett	2 H	H-5', H-6'
7,35	Dublett J = 2 Hz	1 H	H-2'
7,75	Dublett J = 9 Hz	1 H	H-5

Die Flavanon-Grundstruktur wurde bestätigt durch die Resonanzsignale der C-Ring-Protonen H-2 (Quartett bei 5,5 ppm mit J = 12 und 4 Hz) sowie der beiden C-3-Protonen (s. Tabelle).

Daß das Flavanon am C-7 substituiert war, bestätigte die Kopplung des Protons H-5, das als scharfes Dublett bei 7,75 ppm

mit einer Kopplungskonstanten von 9 Hz erscheint und somit nur mit dem Nachbarproton H-6 koppelt.

Obwohl die Signale der drei B-Ring-Protonen (zwischen 6,9 und 7,35 ppm) z.T. überlagert erschienen, konnte man die ortho- und meta-Kopplungen von H-6' (7,1 ppm) erkennen und damit eine 3',4'-Substitution des B-Ringes bestätigen.

Damit liegt bei Flavonoid 2 die Struktur eines 3',4',7-Trihydroxyflavanon-3',7-O-diglucosids vor, also ist es identisch mit Butrin (Abb. 14).

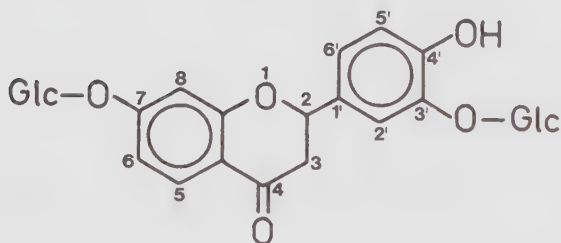


Abb. 14: Struktur von Flavonoid 2 (Butrin)

3. Pharmakologische Untersuchungen

3.1. Hepatozyten-Test nach HIKINO

3.1.1. Ergebnisse

Butrin und Isobutrin wurden in den drei für das Screening gebräuchlichen Konzentrationen gegenüber Silybin als Referenzsubstanz getestet.

Tabelle 10: Antihepatotoxische Aktivität von Butrin und Isobutrin im Hepatozyten-Testmodell

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100±2	100±3
Butrin	0,01	113±1	92±0
	0,1	87±3	81±2*
	1,0	97±3	61±3**
Isobutrin	0,01	81±2*	91±3
	0,1	122±6	73±2*
	1,0	83±5*	32±1**
Silybin (6,142)	0,01	94±2	107±1
	0,1	93±1	98±4
	1,0	31±0**	77±2**

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, wirksam, $p < 0,01$ * oder $p < 0,001$ **, $n = 3$ (57-59)

Butrin hemmte die GPT-Freisetzung aus den Hepatozyten nach CCl₄-induzierter Schädigung in keiner der verwendeten Konzentrationen signifikant. Isobutrin war hier nur schwach wirksam. In diesem Testmodell war bei keinem der Flavonoide eine Dosisabhängigkeit zu beobachten.

Gegen GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten war Butrin dagegen dosisabhängig wirksam. In den beiden höchsten protektiv zugesetzten Dosen war die Wirkung des Flavanons signifikant. Isobutrin zeigte ebenfalls eine dosisabhängige signifikante Wirkung, die deutlich stärker ausgeprägt war als die von Butrin. In der höchsten Dosis (1 mg/ml) reduzierte Isobutrin die GPT-Freisetzung aus den Leberzellen etwa doppelt so stark wie Butrin.

Beide Flavonoide waren im GalN-Modell wirksamer als Silybin. Silybin war nur im CCl_4 -Modell in einer Konzentration von 1 mg/ml gut wirksam.

Im Vergleich zur BuOH-Fraktion (Tab. 4, S. 28) unterschied sich die Wirkung von Butrin im GalN-Modell nicht. Isobutrin war jedoch fast doppelt so wirksam (bei 1 mg/ml).

Um vorgetäuschte positive Testergebnisse infolge einer Enzyminhibition auszuschließen, wurde noch der direkte Einfluß auf die Transaminaseaktivität bestimmt (vgl. Kap. 2). Der mit der BuOH-Fraktion durchgeführte Versuch ergab eine gegenüber dem Standardmedium gesteigerte Aktivität von GPT (112%, Dosis: 1 mg/ml). Daraus geht hervor, daß die Fraktion tatsächlich antihepatotoxisch wirkte und daß ihre Aktivität noch etwas größer sein mußte, als es die gemessenen Werte anzeigten, da die Meßwerte bei einer Stimulation der Enzymaktivität höher hätten ausfallen müssen.

Aus diesem Test ging klar hervor, daß das Chalkon Isobutrin das Hauptwirkprinzip der BuOH-Fraktion darstellt. Das Flavanon Butrin ist nur in geringerem Ausmaß an der antihepatotoxischen Wirkung von Butea monosperma beteiligt.

3.1.2. Vergleich mit anderen Flavonoiden

Ein Vergleich mit den von HIKINO und Mitarb. für andere Flavonoide erhaltenen Werten (für die Dosis 1 mg/ml) zeigte, daß Flavonoid-O- und -C-glykoside im GalN-Schädigungsmodell durchweg stärkere antihepatotoxische Wirkung besitzen als im CCl_4 -Modell. Mit CCl_4 als schädigendem Agens hemmen Flavonoidglykoside nicht oder nur sehr schwach den Austritt der Trans-

aminasen. Dabei spielt es keine Rolle, ob ein Flavon- oder ein Flavonol-Gerüst vorliegt (20,53,83). Die mit den Diglucosiden Butrin und Isobutrin erhaltenen Werte korrelieren sehr gut mit diesen Befunden.

Die Wirkung von Isobutrin gegen GalN-induzierte Hepatotoxizität lag in derselben Größenordnung wie die des Flavonglucosids Homoplantaginin (83), des Flavon-C-glucosids Swertiajaponin (53) und der Flavonolglykoside Isorhamnetin-3-galactosid (Cacticin) und -3-glucosid (20).

Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich vorerst noch nicht ableiten, da andere Chalkone und Flavanoglykoside in diesen Testmodellen noch nicht getestet worden sind und keine der bisher untersuchten Flavonoide ähnliche oder vergleichbare Substitutionsmuster aufweisen.

3.2. Stimulierung der RNA-Synthese in Zellkernen aus Rattenleber nach SONNENBICHLER

3.2.1. Ergebnisse

In diesem Testsystem wurde geprüft, ob die BuOH-Fraktion bzw. die isolierten Flavonoide die RNA-Synthese in Rattenleberzellkernen zu stimulieren vermochten (s. Kap. 2). Den zeitabhängigen Einbau von Tritium-markiertem UTP in die RNA nach Zusatz der BuOH-Fraktion sowie der beiden Flavonoide Butrin und Isobutrin in einer Konzentration von jeweils 20 µg/ml zeigt Abb. 15.

Die im Hepatozyten-Test von HIKINO aktive BuOH-Fraktion war in diesem Test in der verwendeten Konzentration nicht wirksam. Jedoch stimulierten sowohl Butrin als auch Isobutrin den Einbau von ³H-UTP in die RNA der Zellkerne. Das Chalkon Isobutrin erwies sich wieder als die wirksamere Verbindung. Die Kurve für das Flavanon Butrin lag deutlich unter der des Chalkons. Im Vergleich zur Kontrolle (nur Zusatz des Lösungsmittels DMSO) erhielten wir nach 15-minütiger Inkubation mit den Testsubstanzen für die BuOH-Fraktion eine 8,5-, für Butrin eine 63- und für Isobutrin eine 79-prozentige Steigerung der gemessenen Radioaktivität. Die Werte für Silybin liegen dagegen nur etwa 20-30% über den Kontrollen (96,140). Beide Flavonoide waren in die-

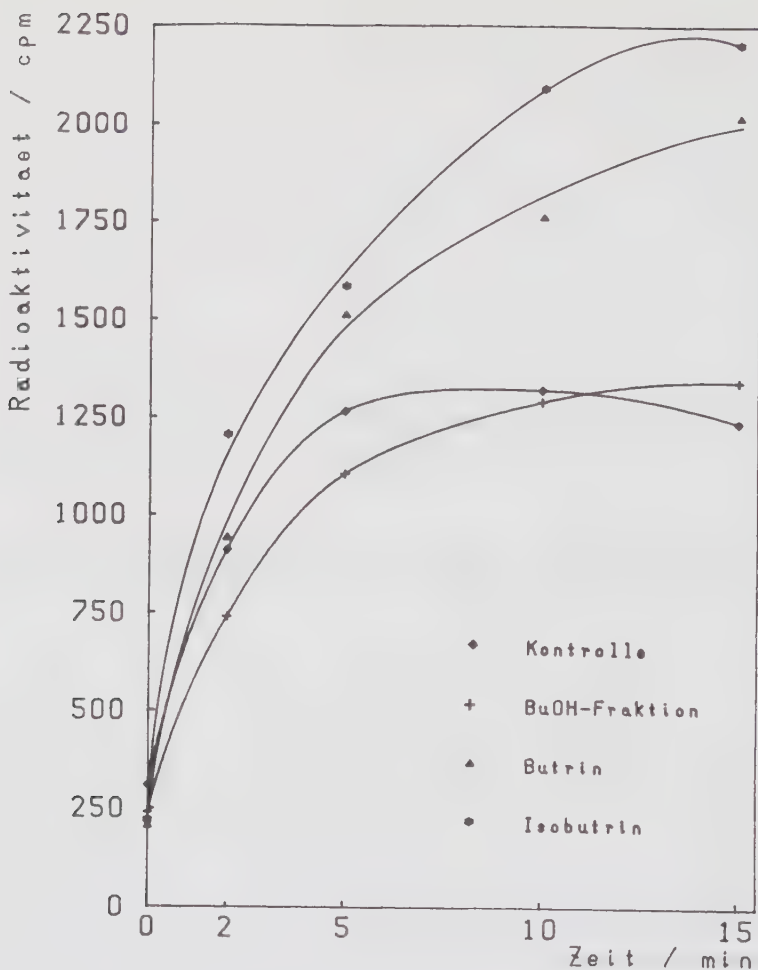


Abb. 15: Zeitverlauf des ^3H -UTP-Einbaus in die RNA von Rattenleberzellkernen in Gegenwart von Substanzen aus *Butea monosperma*

sem Testmodell stärker wirksam als Silybin.

Da die Stimulierung des ^3H -UTP-Einbaus sehr von der eingesetzten Konzentration abhängt und bei niedrigen Flavonoidkonzentrationen die Stimulierung der RNA-Synthese erfahrungsgemäß

meist stärker ausgeprägt ist (96,140), testeten wir die bei 20 µg/ml unwirksame BuOH-Fraktion noch in einer Konzentration von 5 µg/ml. Wir erhielten bei der zeitabhängigen Messung der Radioaktivität nach 15 min eine 28%ige Steigerung der cpm-Werte im Vergleich zur Kontrolle (1250 cpm (MW aus 2 Messungen), BuOH-Fraktion: 1600 cpm). In dieser niedrigeren Konzentration stimulierte auch die BuOH-Fraktion den Einbau von ^3H -UTP in die RNA. Verglichen mit den isolierten Flavonoiden war diese Wirkung erwartungsgemäß wesentlich schwächer.

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit denen aus dem Screening-Test, obwohl ein völlig anderer Wirkungsmechanismus zugrundeliegt. Isobutrin war auch in diesem Test wirksamer als das Flavonon Butrin.

3.2.2. Vergleich mit anderen Flavonoiden

Die Flavonoide Hesperetin, Taxifolin, Gossypetin und Iridin sowie der Gerbstoffbaustein Catechin stimulieren die RNA-Synthese im Kernsystem ähnlich wie Silybin (96). SONNENBICHLER diskutierte (85,96), daß der Abstand der O-Funktionen von Bedeutung für die Wirkung sein könnte. Die genannten aktiven Verbindungen tragen alle in den Positionen 5, 7 und 3' eine freie OH-Gruppe. Auch in der Position 4' findet sich stets eine O-Funktion (OH oder OCH_3). Silybin (Formel S. 12) hat in den Positionen 5 und 7 eine freie OH-Gruppe und bei 3' und 4' zwei veretherte Sauerstoffe. Die von uns isolierten Flavonoide Butrin und Isobutrin haben beide auch O-Funktionen (OH bzw. O-Glc) in den Positionen 3' und 4' (entspricht 3 und 4 bei dem Chalkon) sowie 7 (bzw. 4') (Abb. 11, S.42 u. Abb. 14, S.46). Die höhere Wirksamkeit von Isobutrin im Vergleich zu Butrin könnte damit erklärt werden, daß dieses Molekül eine freie OH-Gruppe in der Position 2' trägt, die der Position 5 bei anderen Flavonoiden entspricht und die nach den bisher vorliegenden Ergebnissen für eine Wirkung in diesem Testmodell wichtig ist.

Damit passen die mit Isobutrin und Butrin erhaltenen Ergebnisse gut zu den von SONNENBICHLER und Mitarb. erstellten Struktur-Wirkungsbeziehungen von Flavonoiden.

3.3. Phalloidin-Antagonisierung in vitro nach RAO

Für die BuOH-Fraktion erhielten wir nach protektiver Verabreichung von 29,8 µg/ml (50 µM, bezogen auf das MG 596 der beiden Flavonoide) einen 40%igen Schutz der Hepatozyten vor Phalloidin-induzierter Schädigung (Mittelwert aus zwei Versuchen). Damit war die Fraktion wenig wirksam. Weitere Untersuchungen wurden zunächst nicht durchgeführt, da nach RAO (91) nur Schutzwirkungen von 100% beim Test mit einer Dosis von 50 µM als interessant anzusehen sind.

3.4. Test an der phalloidinvergifteten Maus

Die Untersuchungen wurden zunächst nur mit dem MeOH-Extrakt durchgeführt.

Der Extrakt zeigte nur eine schwache und nicht dosisabhängige Schutzwirkung vor Phalloidinintoxikationen bei Mäusen (Abb. 16). Direkt nach der intravenösen Applikation des Extraktes zeigten die meisten Tiere als Nebenwirkung für 1 bis 2 min Betäubungserscheinungen wie z.B. torkelnder Gang (92).

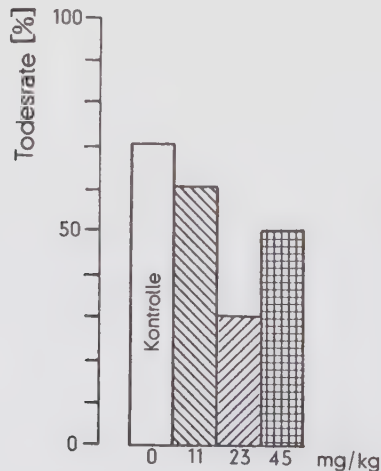


Abb. 16: Effekt des MeOH-Extraktes aus *Butea monosperma*-Blüten auf die phalloidinvergiftete Maus (Todesraten)

4. HPLC-Untersuchungen

Zur quantitativen Bestimmung des Wirkprinzips Isobutrin war die HPLC mit RP18-Säulen unter Einsatz der Photodiodenarray-Detektionstechnik geeignet. Diese Detektionsmethode, die gleichzeitig bei verschiedenen Wellenlängen erfolgen kann, hat allgemein folgende Vorteile:

- Die Peaks können aufgrund von on-line, d.h. ohne Unterbrechung der HPLC-Trennung, aufgenommenen UV-Spektren identifiziert werden. Somit besteht Unabhängigkeit von Vergleichssubstanzen bei der analytischen Untersuchung. Außerdem ist es dadurch möglich, Aussagen über die Struktur von Verbindungen zu machen, die nur in sehr geringen Mengen in Extrakten vorkommen und nicht in genügender Menge isoliert werden können.
- Die Aufnahme der UV-Spektren an der aufsteigenden Flanke, der Spitze und der absteigenden Flanke eines Peaks und Übereinanderprojektion der einzelnen Spektren in einem Plot erlaubt Aussagen über die Peakreinheit. Deckungsgleiche Spektren bedeuten sehr wahrscheinlich, daß der Peak "rein" ist.
- Man kann die bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommenen Chromatogramme übereinander ausdrucken lassen und dadurch auch z.B. Aussagen über die Peakreinheit und -zuordnung treffen.

Eine genaue Beschreibung der HPLC-Methode gibt BAUER (143).

4.1. Analytische HPLC der BuOH-Fraktion

Zunächst verwendeten wir Säule und Fließmittel wie in TS II und setzten zur Detektion das Photodiodenarray ein (TS III). Das Chromatogramm der BuOH-Fraktion sowie die on-line aufgenommenen UV-Spektren von Butrin (Peak A), Isobutrin (Peak B) und Flavonoid 3 (Peak C) sind in Abb. 17a (oben) wiedergegeben. Infolge der unterschiedlichen UV-Spektren von Butrin und Isobutrin war eine Zuordnung auch ohne Vergleichssubstanzen möglich. Bestätigt wurde die Zuordnung durch Überspritzen mit den isolierten Flavonoiden (TS I).

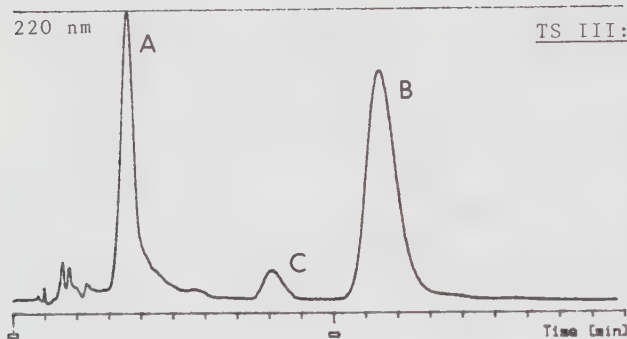
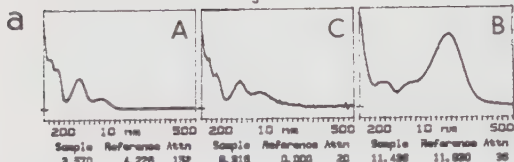
Das UV-Spektrum von Peak C (Flavonoid 3, vgl. S. 29) war dem von Butrin sehr ähnlich. Es sollte sich deshalb auch hier um ein Flavanon handeln.

Für eine quantitative Bestimmung durch Integration der Peakflächen war TS III wenig geeignet, da das starke Peaktailing und die breiten Peaks die genaue Integration erschwerten.

File: BUTEA
Date: 05/24/1984

BUTEA MONOSPERMA
origin

BuOH-Fraktion
sample 1d.



Zuordnung:

A = Butrin

B = Isobutrin

C = Flavonoid 3

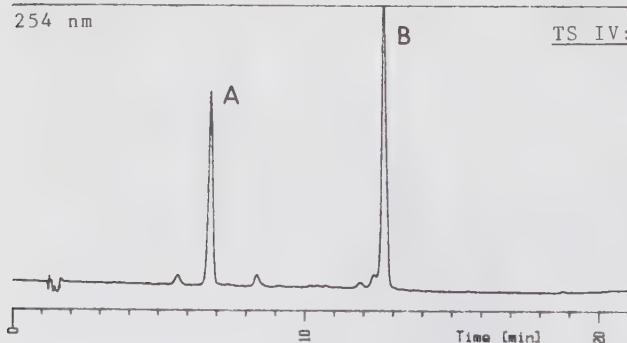
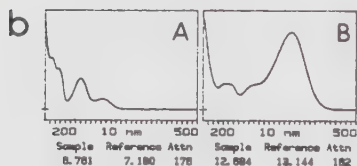


Abb. 17: Vergleich der HPLC-Chromatogramme der BuOH-Fraktion in zwei Trennsystemen (TS III und TS IV, s. Exp. Teil IV. 1.3.)

Eine wesentliche Verbesserung der Trennung gelang durch:

- Einsatz der neuen LiChrospher RP18-Säulen anstelle der bisher verwendeten μ -Bondapak C18-Säulen.
- Modifikation des Fließmittels durch Verwendung von Acetonitril-Wasser- anstatt Methanol-Wasser-Gemischen.
- Zusatz einer Säure zum Fließmittel. Phosphorsäure erwies sich als gut geeignet, da damit auch unterhalb 240 nm detektiert werden kann, was bei Verwendung von Essigsäure nicht möglich ist.
- Übergang vom isokratischen Betrieb auf Gradientenelution.

Das Chromatogramm der BuOH-Fraktion in TS IV zeigt Abb. 17b.

Die Reinheit des Butrin- bzw. Isobutrin-Peaks wurde durch Aufnahme der UV-Spektren an den drei bereits genannten Stellen der Peaks, die exakt übereinstimmten, bestätigt. Da es möglich war, daß in der Fraktion Verbindungen enthalten waren, die bei den bisher verwendeten Detektionswellenlängen nicht erfassbar waren, ließen wir das Chromatogramm bei verschiedenen Wellenlängen (u.a. 210 nm) ausdrucken. Es erschienen keine weiteren Peaks.

4.2. Quantitative Bestimmung von Isobutrin in der BuOH-Fraktion

Zur quantitativen Erfassung der Wirkverbindung Isobutrin wählten wir die Methode des externen Standards. Wir verwendeten TS IV und als selektive Detektionswellenlänge das UV-Absorptionsmaximum von Isobutrin (375 nm).

Die chromatographische Reinheit der durch präparative DC isolierten Eichsubstanz (s. S. 35) wurde auf die übliche Weise mit Hilfe der HPLC bestätigt (Abb. 18).

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden unterschiedliche Mengen einer Isobutrin-Eichlösung (0,02%) eingespritzt und die Peakflächen mit Hilfe eines Integrators ermittelt. Im Bereich 0,2 bis 1 μ g bestand ein lineares Verhältnis zwischen der Peakfläche und der Menge an Isobutrin (μ g) (Abb. 19).

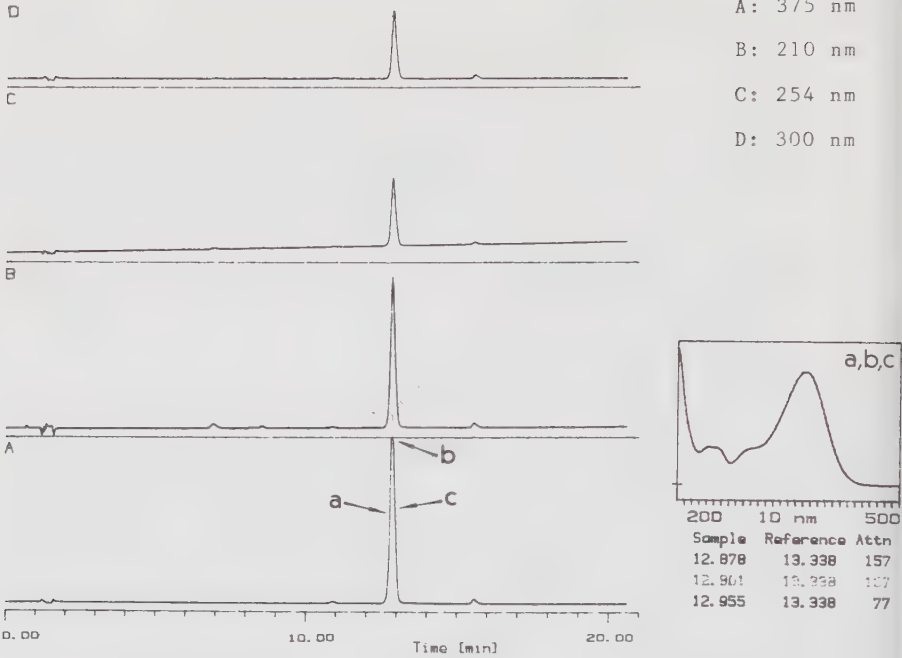


Abb. 18: Chromatographische Reinheit des isolierten Isobuttrins
(Detektion bei verschiedenen Wellenlängen, TS IV)

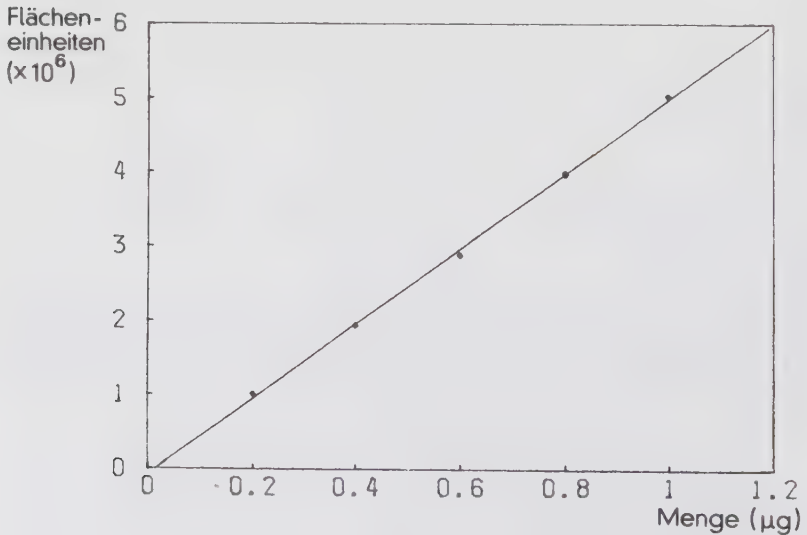


Abb. 19: Eichgerade von Isobutrin

Wir errechneten mit Hilfe eines Computerprogramms (lineare Regression) für die Eichgerade die folgende Gleichung:

$$x = 0,012645 + 0,198188 y \quad \text{mit } x = \text{Menge Isobutrin } (\mu\text{g})$$

$$y = \text{Flächeneinheiten}$$

(Standardabweichung: 0,011,

Korrelationskoeffizient: 0,9994)

Nach experimenteller Bestimmung der Peakfläche von Isobutrin (y) im HPLC-Chromatogramm der BuOH-Fraktion konnte nach der obigen Gleichung die entsprechende Menge Isobutrin (x) errechnet werden. Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 11: Gehaltsbestimmung von Isobutrin in der BuOH-Fraktion

Bestimmung	Menge BuOH-Fraktion (μg)	Flächen-einheiten ($\times 10^6$)	Menge Isobutrin (μg)	Gehalt (%)
1	2,0	5,0482	1,013	50,65
2	2,0	4,9526	0,944	49,70
3	1,6	3,9368	0,793	49,56
4	1,2	2,9780	0,603	50,25
				$\bar{x} = 50,04$
				$S = 0,254$
				$s = 0,504$
				$\Delta\bar{x} = 0,252$
				$s_{\text{rel.}} = 1,007\%$

Wir erhielten für die BuOH-Fraktion einen mittleren Gehalt von 50 % Isobutrin. Die relative Standardabweichung der Bestimmung betrug 1 %.

Dieses Ergebnis korreliert gut mit dem des Hepatozyten-Tests. Die BuOH-Fraktion, die 50% des Chalkons enthält, wirkt im GalN-Modell nur etwa halb so stark wie Isobutrin selbst (s. Tab. 4 und 10). Damit ist erneut bewiesen, daß Butrin an der Gesamtwirkung der Fraktion nur wenig beteiligt sein kann.

4.3. Quantitative Isobutrin-Bestimmung im MeOH-Extrakt

Ein HPLC-Fingerprint des MeOH-Extraktes (TS IV) ist in Abb. 20 wiedergegeben.

Butrin und Isobutrin waren die Hauptverbindungen. Bei einem Vergleich der Peakhöhen bei gleichen Einspritzmengen stellten wir fest, daß im Gesamtextrakt im Verhältnis zu Isobutrin mehr Butrin enthalten war als in der BuOH-Fraktion. Wahrscheinlich hatte sich während der Anreicherung das Gleichgewicht zwischen Flavanon und Chalkon verschoben. Dies könnte z.B. durch die Wärmeeinwirkung beim Einengen bedingt sein (107,109-111). Dagegen hatten unsere Versuche, z.B. nach (110) oder (113), das Flavanon in das Chalkon bzw. umgekehrt umzuwandeln, zu keinem Erfolg geführt.

Nach den on-line registrierten UV-Spektren der Peaks D, E und F (Abb. 20) sollte es sich bei D und E um Flavanone und bei F um ein Chalkon handeln.

Verglichen mit dem Spektrum von Butrin (Abb. 12, S. 43) war Bande II im Spektrum von D gleich, die vom Ring B stammende Bande I jedoch bathochrom verschoben. Damit könnte es sich um Isocoreopsin handeln. Bei diesem Flavanon muß Bande I aufgrund der freien OH-Gruppe am Ring B im Vergleich zu Butrin (mit glucosidierter OH-Gruppe) bathochrom verschoben sein.

Das Spektrum von Peak E entsprach dem von Peak C (Flavonoid 3, Abb. 17a) und könnte von Isomonospermosid stammen. Die freie C-7-OH-Gruppe hat eine bathochrome Verschiebung von Bande II nach 276 nm zur Folge. Bande I bleibt wegen derselben B-Ring-Substitution vergleichsweise unverändert.

Peak F mit einem zu Isobutrin identischen Spektrum könnte von Monospermosid oder Coreopsin stammen, da eine Glykosidierung von OH-Gruppen wenig Effekt auf das UV-Spektrum von Chalkonen hat. (Formeln der Verbindungen s. S. 26) (109,127,128).

Für den MeOH-Extrakt ermittelten wir einen Isobutrin-Gehalt von 21,5% ($n = 6$, relative Standardabweichung der Bestimmung: 0,45%) (vgl. (111)). Durch die Anreicherung war der Isobutrin-Gehalt um das 2,3-fache gestiegen.

File: BUTEA

BUTEA MONOSPERMA
· origin

MeOH-Extrakt
sample id.

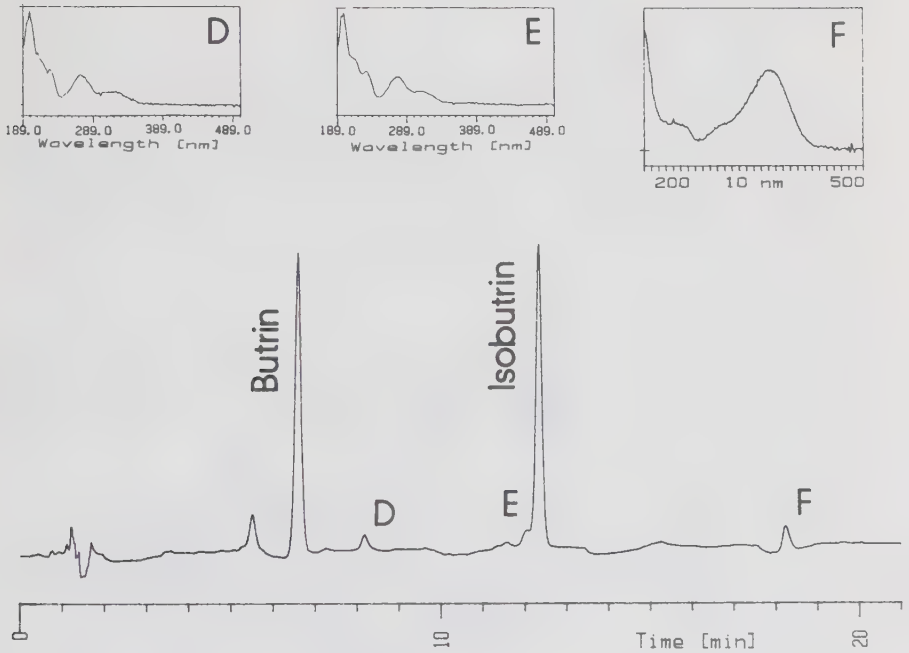


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm des Methanolextraktes aus
Butea monosperma-Blüten

Detektion: 254 nm (Attn. 40 mAU)

TS IV (s. Exp. Teil III. 1.3.)

Mögliche Zuordnung: D = Isocoreopsin
E = Isomonospermosid
F = Monospermosid oder Coreopsin

KAPITEL 4 A:

PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON ECLIPTA ALBA (L.) HASSK.

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Systematische Einteilung und Verbreitung

Eclipta alba (L.) Hassk. gehört zur Familie Asteraceae (= Compositae). Nach ENGLER (106) ist die Gattung *Eclipta* innerhalb der Unterfamilie Asteroideae (= Carduoideae, = Tubiflorae) dem Tribus Heliantheae und dem Subtribus Helianthinae (= Verbesininae) zuzuordnen.

Im Gegensatz zu ENGLER, der die Heliantheae in 11 Subtriben unterteilt, unterscheidet STUESSY (144) 15 Subtriben. Nach diesem Autor gehört die Gattung *Eclipta* zur 2. informellen Gruppe des Subtribus *Ecliptinae* Less.

Von der Gattung *Eclipta* existieren vier Arten, die in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde beheimatet sind. In Indien ist *Eclipta alba* die einzige heimische Art. Die Pflanze wächst dort in kühlen, feuchten Gebieten als Unkraut (23, 31, 146).

In der Literatur findet man zahlreiche synonyme Bezeichnungen für *Eclipta alba*: *Eclipta prostrata* Roxb., *Eclipta erecta* L., *Eclipta punctata* L., *Verbesinia prostrata* L., *Verbesinia alba* L. und *Eclipta thermalis* Bunge (23, 108, 145, 147, 148).

Die wichtigsten einheimischen Bezeichnungen für *Eclipta alba* lauten: Bhringaraja, Kesaraja, Kesuti, Kesuria, Maka, Markara, Babri, Galagara und Safed Bhangra (blühende Pflanze) bzw. Kala Bhangra (fruchttragende Pflanze) (16, 23, 31, 146, 147, 247).

1.2. Botanische Beschreibung

Eclipta alba ist eine kleine, 10 bis 60 cm hohe, aufrechte oder niedergestreckte, reich verzweigte, einjährige Pflanze.

Die Blätter sind gegenständig angeordnet, ungestielt und lanzettförmig. Sie sind 30-100 mm lang und 5-25 mm breit, gezähnt, und beiderseits dicht borstig behaart.

Die kleinen glockenförmigen Blütenköpfchen haben einen Durchmesser von 6-9 mm und sitzen auf 20-45 mm langen Stielen.

Sie sind achsen- oder endständig und von weißer Farbe. Die innere röhrenförmige Blüte ist zwittrig, die äußere weiße Blüte ist weiblich. Auch eine schwarzblühende Varietät ist bekannt. Die Pflanze blüht das ganze Jahr.

(16,24,31,45,108,145,146)



Abb. 21

ECLIPTA ALBA (L.) HASSK.

Habituszeichnung aus "The Wealth of India" (146)

1.3. Verwendung in der Volksmedizin und bisherige pharmakologische Untersuchungen

In Indien wird *Eclipta alba* häufig volksmedizinisch verwendet. In der Ayurvedischen Medizin (196) gilt *Eclipta alba* als das beste Mittel gegen Leberzirrhose und wird häufig bei Gelbsucht eingesetzt (16,24,33,149). Die Pflanze ist Bestandteil des Ayurvedischen Präparats Liv 52[®] mit den Indikationen: "Leberschutz gegen verschiedene Hepatotoxine, Korrektur von Leberdysfunktionen und -schäden, Förderung von Wachstum und Appetit". Dieses Präparat zeigte bei Mäusen, Ratten und Kaninchen protektive Eigenschaften gegen die hepatotoxischen Wirkungen von CCl_4 (24,151,152).

Die Blätter werden bei Erkrankungen der Leber und Galle verwendet, so z.B. als Cholagogum und Stomachikum, als Lebertonikum und bei Obstruktionen aufgrund von Vergrößerungen der Milz und Leber (16,23,24,31,150).

Der frische, aus den Blättern gewonnene Preßsaft wird gegen katarrhalische Gelbsucht angewandt (16,23,31).

Eclipta alba gilt in Indien als Ersatzdroge für die Leber- und Gallendroge *Taraxacum officinale* (16,45,247).

Bei dem von DHAR und Mitarb. durchgeführten Screening indischer Heilpflanzen war ein Extrakt aus getrockneter *Eclipta alba*-Droge gegen das Ranikhet-Virus wirksam, beeinflusste den Blutdruck und wirkte spasmolytisch am Meerschweinchen-Ileum. Bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg traten bei Mäusen keine toxischen Effekte auf (153).

THYAGARAJAN und Mitarb. fanden eine inaktivierende Wirkung eines *Eclipta alba*-Präparats auf ein Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus, was möglicherweise auf eine antivirale Wirksamkeit hindeutet (33).

Auch über antibiotische Aktivität eines Sproß-Extraktes gegen *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* wird berichtet (31,146).

Ein Wasserextrakt soll nematodenvernichtend wirken (156).

MA-MA und Mitarb. ermittelten, daß der Preßsaft aus frischen Blättern von *Eclipta alba*, protektiv in einer Dosis von 6,6 ml/kg p.o. verabreicht, Meerschweinchen signifikant vor akuten durch CCl_4 induzierten Leberschäden schützte. Dieser protektive Effekt wurde aufgrund der im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erniedrigten Mortalitätsrate, verminderten Serum-enzymaktivitäten und geringeren histologisch feststellbaren Nekrosebildung postuliert. Allerdings wurden diese Ergebnisse nicht durch weitergehende Untersuchungen belegt (32).

Klinisch erfolgreich angewandt wurde *Eclipta alba* gegen infektiöse Hepatitis bei Erwachsenen und Kindern (155). Kindern mit Gelbsucht wurde täglich 50 mg gepulverte Droge pro kg gegeben. In 40 von 50 Fällen soll eine "komplette Genesung" eingetreten sein. Nebenwirkungen wurden keine beobachtet. Allerdings sind die von DIXIT und ACHAR angegebenen Daten unvollständig, z.B. fehlen Angaben über eine Patienten-Kontrollgruppe (155).

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Aus *Eclipta alba* wurde eine Vielzahl an Verbindungen aus den unterschiedlichsten Stoffklassen isoliert (Tabelle 12).

Obwohl *Eclipta alba* besonders von indischen Arbeitskreisen gut phytochemisch untersucht wurde, gibt es keine Hinweise über die für die hepatotrope Wirkung dieser weitverbreitet angewandten Droge verantwortlichen Wirkprinzipien.

KRISHNASWAMY und Mitarb. (150) berichteten lediglich, daß Wedelolacton, der erste Vertreter der neuen Naturstoffklasse der Coumestane, keine bemerkenswerte pharmakologische Aktivität besitzen und insbesondere nicht gegen Gelbsucht wirken soll.

Tabelle 12: Bisher bekannte Inhaltsstoffe von *Eclipta alba*

Verbindung	Stoffklasse	Literatur
Wedelolacton	Coumestan	31,144,150,154, 158,162
Demethylwedelolacton	Coumestan	31,144,158,160, 162
Demethylwedelolacton- 7-glucosid	Coumestanglykosid	31,160,161
Apigenin	Flavon	158
Luteolin	Flavon	158
Apigenin-7-glucosid	Flavon-O-glykosid	158
Luteolin-7-glucosid	Flavon-O-glykosid	154,158
Nicotin (= "Ecliptin")	Alkaloid	144,150,157
Triterpen "C"	Triterpenglykosid	154
β -Amyrin	Sterin	31,150,154,158
Stigmasterol	Sterin	31,150,158,159, 162,163
β -Sitosterol	Sterin	158
Hentriacontan-16-ol	langkettiger Alkohol	159
Heptacosan-14-ol	langkettiger Alkohol	159
α -Terthienylmethanol (= Terthienylcarbinol)	Thiophenacetylen	31,150,162,163
Thiophenacetylene	-	144,164,165
Thiophen-Derivate	-	164
Polyacetylene	-	164
Peptide	-	31,163

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Herstellung einer EtOAc-Fraktion

Die Screening-Untersuchungen von FIEBIG (6) hatten ergeben, daß das Wirkprinzip von *Eclipta alba* höchstwahrscheinlich in einer EtOAc-Fraktion zu suchen war.

Wir stellten durch Soxhlet-Extraktion mit Methanol einen Gesamtextrakt her (Ausbeute: 22% des eingesetzten Drogenmaterials). Zur Entfernung der Ballaststoffe erwies sich ein Digerieren mit Wasser als beste Methode (Verfahren s. Exp. Teil IV. 2.2., S. 149). Die nach vollständiger Abtrennung der Ballaststoffe verbleibende wäßrige Phase wurde erschöpfend mit Ethylacetat ausgeschüttelt, wobei 3,2 g EtOAc-Fraktion (EtOAc 1) als braunes Pulver erhalten wurden.

2.2. DC-Untersuchungen

Zur DC-Auftrennung der EtOAc-Fraktion erwies sich das Fließmittel Toluol-Aceton-Ameisensäure (11:6:1) (LM I) als am besten geeignet. Nach Detektion im UV und mit dem Naturstoff/PEG-Reagens wurden im mittleren R_f-Bereich drei Hauptverbindungen (E1, E2 und E3) erhalten. Im unteren R_f-Bereich wurden zwei weitere, schwach ausgeprägte Zonen (E4 und E5) detektiert (s. Abb. 22). Die phenolischen Verbindungen E1 - E5 ließen sich auch mit dem Eisen-III-chlorid-Reagens detektieren.

Die DC-Trennung der EtOAc-Fraktion in LM I ist in Abb. 22 wiedergegeben.

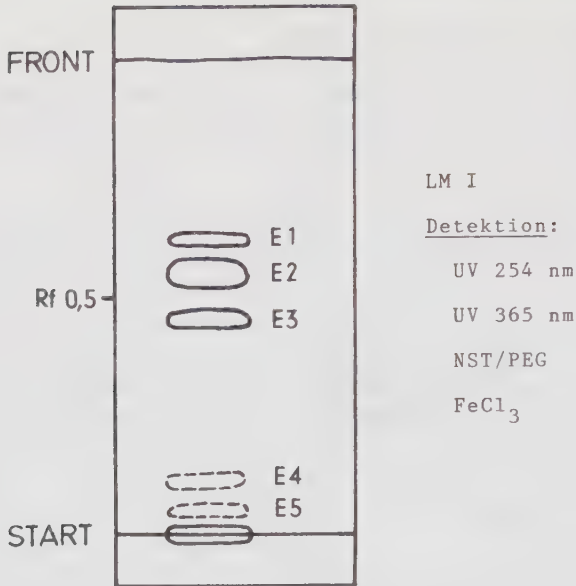


Abb. 22: DC-Trennung der EtOAc-Fraktion aus *Eclipta alba*

Tabelle 13: Detektionsverhalten von E1 - E5

	E1	E2	E3	E4/E5*
vis	gelb	graubraun	graugrün	-
UV 254 nm	Fl.-Mind.	Fl.-Mind.	Fl.-Mind.	Fl.-Mind.
UV 365 nm	braun	orange	blau	schwach blau
FeCl ₃ vis	braun	grün	grün	graugrün
NST/PEG vis	orange	gelbgrün	gelbgrün	gelb
UV	orange	gelbgrün	gelbgrün	gelbgrün
Echtblau-salz vis	gelbbraun	grün	grünbraun	-

* Die Färbungen von E4 und E5 waren nur schwach ausgeprägt

Vergleichende DC-Untersuchungen zeigten, daß die EtOAc-Fraktion in ihrem DC-Bild exakt mit der von FIEBIG (6) hergestellten Fraktion übereinstimmte.

Durch Co-Chromatographie mit den in *Eclipta alba* beschriebenen Flavonoiden (Tab. 12, S. 64) ließ sich die Zone E1 dem Apigenin zuordnen.

Nach Rf-Wert und Farbreaktionen stimmte E2 mit Luteolin überein. Allerdings stellten wir fest, daß es sich bei der Zone E2 vermutlich nicht um eine einheitliche Zone handelte, sondern daß sie aus mindestens zwei Verbindungen bestand.

Apigenin-7-glucosid und Luteolin-7-glucosid (154,158) waren nach vergleichenden DC-Untersuchungen in verschiedenen Laufmitteln nicht in der EtOAc-Fraktion enthalten.

2.3. Pharmakologisches Screening

Im Hepatozyten-Test zeigte die EtOAc-Fraktion sowohl gegen CCl_4 - als auch gegen GalN-induzierte Schädigungen eine sehr starke antihepatotoxische Aktivität, womit die Ergebnisse von FIEBIG (6) bestätigt werden konnten. Die EtOAc-Fraktion nach (6) und die von uns hergestellte Fraktion wirkten in diesem Testmodell etwa gleich stark (Tabelle 14).

Die gemessene Wirkung war die stärkste, die bis heute für einen Pflanzenextrakt bzw. eine Rohfraktion gefunden worden ist (6, 53,57).

Im Kontrollversuch betrug die Transaminaseaktivität nach Zusatz der Fraktion zum Standardmedium 56% der Kontrollen (Dosis: 1 mg/ml; Kontrolle: 400 U/l, EtOAc-Fraktion: 223 U/l). Dies erklärt jedoch nicht die im Test erzielte, statistisch hochsignifikante Erniedrigung der GPT-Aktivität auf 13% der Kontrollwerte.

Tabelle 14: Wirkung der EtOAc-Fraktion im Hepatozyten-Test

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100±3	100±2
EtOAc-Fraktion	0,01	100±3	104±4
	0,1	81±5	76±2*
	1,0	13±1**	13±2**
EtOAc-Fraktion nach (6)	1,0	11±1**	6±1**

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, wirksam, $p < 0,01^*$ oder $p < 0,001^{**}$, $n = 3$.

2.4. Isolierung

2.4.1. Säulenchromatographie

Als säurefreies Laufmittel für die Säulenchromatographie entwickelten wir das System Dichlormethan-Methanol-Wasser (14:9:4) (Unterphase) (LM II). In diesem Laufmittel erschien auch E2 als einheitliche Zone mit auffallender blauer Fluoreszenz ähnlich wie E3.

Nach Säulenchromatographie der EtOAc-Fraktion an Kieselgel 60 erhielten wir E1 und E2 in DC-reiner und E3 in stark angereicherter Form (vgl. Exp. Teil IV. 2.4.1.)

2.4.2. Präparative Schichtchromatographie

Die Endreinigung von E3 erfolgte durch präparative DC auf vorentwickelten Kieselgel-Fertigplatten von 0,5 mm Schichtdicke (s. Exp. Teil) mit LM I. Nach Elution des Kieselgels mit Aceton und Membranfiltration konnten insgesamt 36 mg DC-einheitliches E3 gewonnen werden.

Die isolierten Verbindungen E1, E2 und E3 erwiesen sich auch bei der DC auf HPTLC-Platten als rein (LM I, II und III).

2.4.3. Analytische HPLC

Die Reinheitsprüfungen der isolierten Verbindungen führten wir mit Hilfe der HPLC durch. Wir verwendeten eine analytische μ -Bondapak C18-Säule und als Fließmittel 24%iges Acetonitril unter Zusatz von 1% Essigsäure (isokratischer Betrieb). Detektiert wurde bei 240 und 254 nm (TS I, s. Exp. Teil IV. 2.7.). E1 (Rt 16,4 min), E2 (Rt 11,2 min) und E3 (Rt 4,6 min) ergaben nur jeweils einen Peak.

Als zweites Trennsystem verwendeten wir eine LiChrospher RP18-Trennsäule und einen linearen Gradienten: Anstieg von 15 bis 40% Acetonitril mit Phosphorsäurezusatz (0,1N, 10 ml/l) (TS II). Detektiert wurde bei 220 und 254 nm. Auch in diesem Trennsystem bildeten E1 (Rt 24 min), E2 (Rt 19,8 min) und E3 (Rt 13,2 min) nur je einen Peak.

Ein Vergleich der Retentionszeiten nach Einspritzen von authentischem Luteolin und Überspritzungsversuche in TS I und TS II ergaben, daß es sich bei E2 nicht um Luteolin handeln konnte. Authentisches Luteolin hatte in TS I eine Retentionszeit von 10 min und in TS II von 19,6 min.

Dagegen erwies sich E1 auch in der analytischen HPLC auf Umkehrphase als identisch mit Apigenin (Vergleich der Rt und Überspritzungsversuche mit authentischem Apigenin in TS I und TS II).

2.5. Strukturaufklärung

2.5.1. E 1

Die eindeutige Identifizierung von E1 als Apigenin erfolgte durch UV-Spektroskopie mit dem Einsatz von Verschiebungsreagentien (AlCl_3 , AlCl_3/HCl und NaOAc) (127), ein IR-Überlagerungsspektrum mit dem von authentischem Apigenin sowie Massenspektroskopie (M^+ bei m/z 270, Retro-Diels-Alder-Fragmente bei m/z 153 ($(\text{A}_1+\text{H})^{+\cdot}$), 152 ($\text{A}_1^{+\cdot}$), 124 ($(\text{A}_1-\text{CO})^{+\cdot}$) und 123 ($(\text{A}_1-\text{CHO})^{+\cdot}$) sowie das Fragment ($\text{B}_2^{+\cdot}$) bei m/z 121) (109,128).

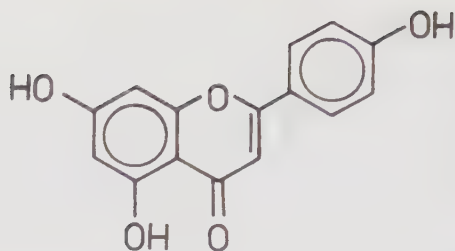


Abb. 23: Strukturformel von Apigenin (E1)

2.5.2. E 2 und E 3

2.5.2.1. Bewertung der UV- und IR-Spektren

Die starke Fluoreszenz der methanolischen Lösungen von E2 und E3 im UV 365 nm und das identische UV-Spektrum beider Verbindungen mit dem Hauptmaximum (Bande I) bei 351 nm und Bande II bei 250 nm sprachen für das Vorliegen von Flavon- bzw. Flavonol- (109,127,128), Cumarin- oder Coumestan-Strukturen (166,167,174,175,176).

Die reduzierte Intensität des bathochrom verschobenen Hauptmaximums nach Zugabe von NaOMe und NaOAc (Tabelle 15) wäre mit dem Vorliegen eines 3,4'-Dihydroxyflavonols oder eines Flavons mit einer A-Ring ortho-Dihydroxy-Substitution (6,7- bzw. 7,8-OH) in Übereinstimmung (127,128). Die erste Möglichkeit ließ sich dadurch ausschließen, daß mit AlCl_3 und HCl keine bathochrome Verschiebung des Maximums erfolgte, die bei Flavonolen mit freier 3-OH-Gruppe 50 bis 60 nm betragen müßte. Für die zweite Möglichkeit sprachen dagegen die UV-Verschiebungen mit AlCl_3 und NaOAc/Borsäure (128).

Allerdings zeigen auch 3',4'-Dihydroxyisoflavone und Coumestane als abgeleitete Isoflavonoide im UV-Spektrum hypochrome Maxima nach Zusatz von NaOMe (127,166,167,174,181). Die Bathochromie von Bande I mit NaOMe und NaOAc würde auf eine 5- und/oder 7-OH-Substitution eines Coumestans* deuten, da beide

Tabelle 15: Bathochrome Verschiebungen von Bande I von E2 und E3 mit Shiftreagentien *

	MeOH	NaOMe	NaOAc	NaOAc/ H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ / HCl
E 2:	351	378(27)(-)	378(27)(-)	360(9)	371(20)(-) 445**	351 445**
E 3:	351	372(21)(-)	372(21)(-)	360(9)	365(14)(-) 450**	351

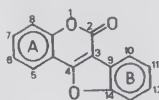
* Angegeben ist jeweils die Lage von Bande I bzw. in Klammern der Differenzwert zum MeOH-Spektrum in nm, (-)=Hypochromie von Bande I

** Zusätzliche Bande im Vergleich zum MeOH-Spektrum

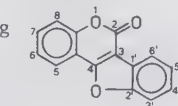
OH-Gruppen infolge der Konjugation mit der Lacton-Carbonylgruppe acide Eigenschaften besitzen.

* In der Literatur findet man drei gebräuchliche Numerierungsmöglichkeiten für das Coumestan-Grundgerüst:

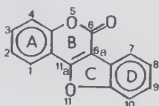
- 1) Coumestan-Numerierung
(109,166,167,174,175)



- 2) Analog der Flavonoid-Numerierung
(161,167,172,176)



- 3) Systematische Numerierung
nach dem Ring-Index
(109,127,167,193)



Außerdem werden zwei weitere, eher willkürliche Numerierungen verwendet ((167,183) bzw. (168)).

Chemical Abstracts benennt das Coumestan-Gerüst 6H-Benzofuro-(3,2c)(1)-benzopyran-6-on (166).

Wir behielten in dieser Arbeit die erste Möglichkeit aufgrund der häufigsten Verwendung in der Literatur bei.

Aufgrund der bathochromen Verschiebung mit NaOAc/Borsäure und AlCl_3 konnte das Strukturelement einer ortho-Dihydroxygruppe bei E2 und E3 als gesichert gelten (166,173,174).

Charakteristisch für die IR-Spektren von E2 und E3 (Abb. 24) war im Carbonyl-Bereich die breite Absorptionsbande bei 1710 cm^{-1} . Nach MABRY (109) und anderen Autoren (129,154,167, 168,175) findet man in diesem Wellenzahlenbereich im Unterschied zu den γ -Chromonen die C=O-Valenzschwingung der δ -Lacton-Carbonylgruppe von Cumarinen oder Coumestanen. Damit konnte eine Flavon-Struktur von E2 und E3 ausgeschlossen werden.

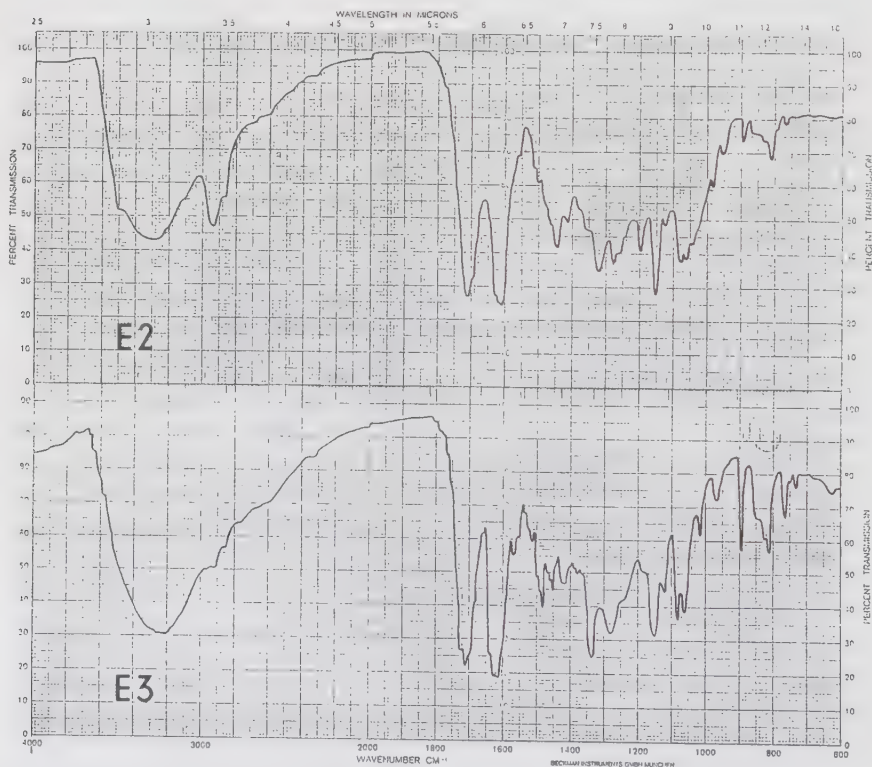


Abb. 24: IR-Spektren von E2 und E3

2.5.2.2. Darstellung der Acetate von E2 und E3

Die Peracetylierung erfolgte wie üblich mit Acetanhydrid und Pyridin bei Raumtemperatur. Wir erhielten aus 6 mg E3 5 mg DC-reines E3-Peracetat. Aus 11 mg E2 gewannen wir 10 mg Rohacetat, das nach Reinigung über eine kleine Kieselgelsäule mit LM IV als Eluens 3 mg chromatographisch reines E2-Acetat ergab.

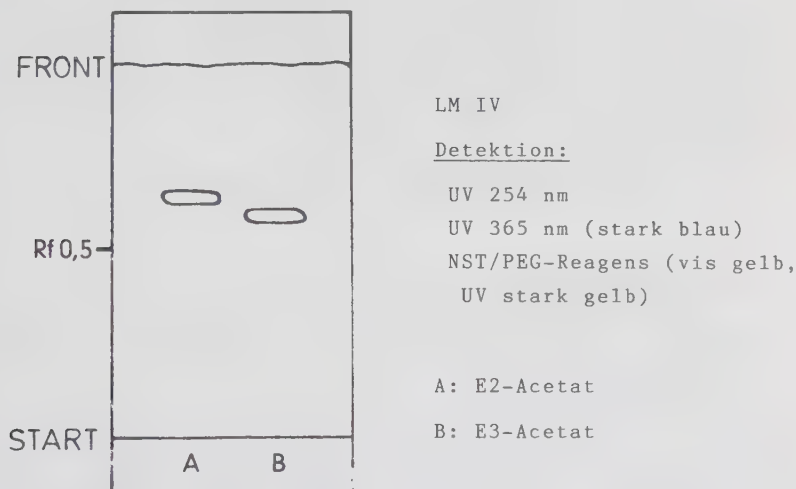


Abb. 25: DC von E2- und E3-Acetat

Die Schmelzpunkte von E2-Acetat (235°) und E3-Acetat (265°) stimmten mit den Literaturwerten für die Coumestan-Derivate Wedelolacton- und Desmethylwedelolactonperacetat gut überein (160-162,184).

Der negative Ausfall der FeCl_3 -Reaktion auf der DC-Platte und die fehlende Hydroxyl-Bande im IR-Spektrum der Peracetate zeigte die vollständige Acetylierung aller OH-Gruppen an (s. Spektrum von E3-Acetat, Abb. 26).

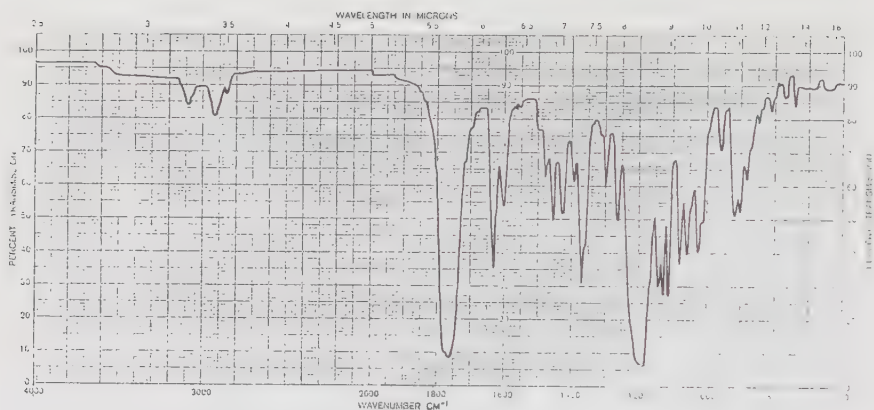


Abb. 26: IR-Spektrum von E3-Acetat

2.5.2.3. Massenspektrometrie

Nach dem Massenspektrum hatte E2 ein Molekulargewicht von 314 (s. Tabelle 16). Im Spektrum war die Abspaltung von CH_3 und der Verlust von 56 Masseneinheiten (CO-CO) auffallend. Diese letztgenannte Abspaltung ist charakteristisch für Cumarine und Coumestane als komplex aufgebaute Cumarine (sie werden auch als "Cumaranocumarine" bezeichnet (109,167,181)). Diese Verbindungen zeigen im Gegensatz zur Retro-Diels-Alder-Fragmentierung der γ -Pyrone (z.B. der Flavone und Isoflavone) den Verlust von CO (28 Masseneinheiten) aus dem α -Pyrone-Ring unter Ausbildung eines Benzofuran-Kations bzw. eines Benzofuran-Derivats. Weiterhin zeigen diese Verbindungen die Abspaltung von CH_3 aus Methoxygruppen und den Verlust von weiteren Sauerstoffen als CO (166,177-180).

E2-Acetat (MG 440, Abb. 27) zeigte die sukzessive, dreimalige Abspaltung von Keten (42 Masseneinheiten, Peaks s. Tab. 16) zum Basispeak bei m/z 314, so daß drei acetylierte, phenolische OH-Gruppen vorhanden sein mußten (180). Wie bei der nicht peracetylierten Verbindung erfolgte anschließend die Abspaltung von CH_3 und CO-CO .

Damit war das Vorliegen des α -Pyrone-Ringes und einer Methoxy-

gruppe in E2 wahrscheinlich.

Die Differenz von 30 Masseneinheiten zwischen einem Triacetoxycoumestan (MG 410) und E2-Peracetat (MG 440) bewies erneut das Vorhandensein einer Methoxygruppe.

Damit sollte Wedelolactonperacetat, ein Triacetoxymethoxycoumestan, vorliegen.

Ähnlich verhalten sich andere Monomethylcoumestane bei der Massenspektrometrie. Tephrosol (6-Methoxy-7-hydroxy-11,12-methylenedioxcoumestan) zeigt die Fragmentierung M-Me, M-Me-CO, M-Me-CO-CO (168). 6-Acetoxy-7-methoxy-11,12-methylenedioxcoumestan hat die Fragmente M-CH₂CO, M-CH₂CO-CH₃ und M-CH₂CO-CH₂-CO (181). Coumestrol-4'-methylether fragmentiert wie folgt: M-CH₃ und M-Me-CO-CO (166). Trifoliol (7,10-Dihydroxy-12-methoxycoumestan) verliert CH₃ und CO, die Trifoliolmonomethylether verlieren dagegen jeweils CH₃ und CO-CO (166). Auch bei 6-Acetoxy-7-methoxy-11,12-methylenedioxcoumestan (181) bildet der nach der Abspaltung von Keten aus der Acetoxygruppe auftretende Peak den Basispeak des Spektrums.

Im MS von E3 waren im Bereich zwischen m/z 300 und 150 praktisch keine Fragmente zu erkennen. Der Molekülpeak bildete den Basispeak des Spektrums. Da das MG von E3 300 betrug, war wahrscheinlich, daß in E3 anstelle einer OCH₃-Gruppe eine weitere OH-Gruppe vorhanden war.

E3-Acetat mit einem MG von 468 zeigte im MS die viermalige aufeinanderfolgende Abspaltung von 42 Masseneinheiten (Peaks s. Tabelle 16) zum Basispeak bei m/z 300. Damit war gesichert, daß diese Substanz ein Tetraacetoxycoumestan und wahrscheinlich identisch mit Desmethylnedelolactonperacetat war.

Nach der Abspaltung eines Protons konnte man den Verlust von 28 (CO aus dem α -Pyron-Ring) und 56 (CO-CO) Masseneinheiten erkennen. Allerdings waren diese Peaks sehr klein (s. Tabelle 16 und Abb. 27).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen bildet auch Coumestrol im MS ein sehr stabiles Molekölion (166). Im Massenspektrum von Sojagol (7-Hydroxy-5',5'-dimethyl-6'-oxa-12,13-cyclohexenocoumestan (174)) treten wie bei E3 insgesamt drei Abspaltungen von CO auf. Die entsprechenden Peaks sind auch hier sehr klein.

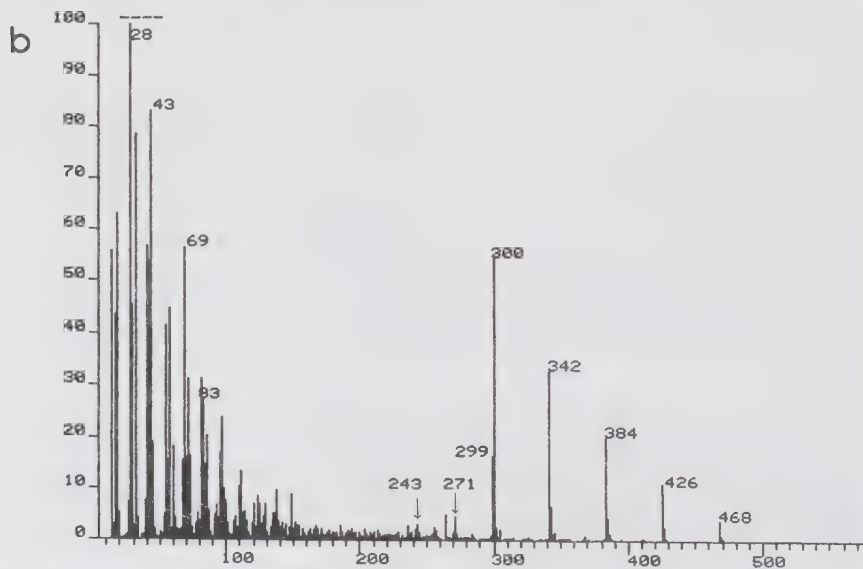
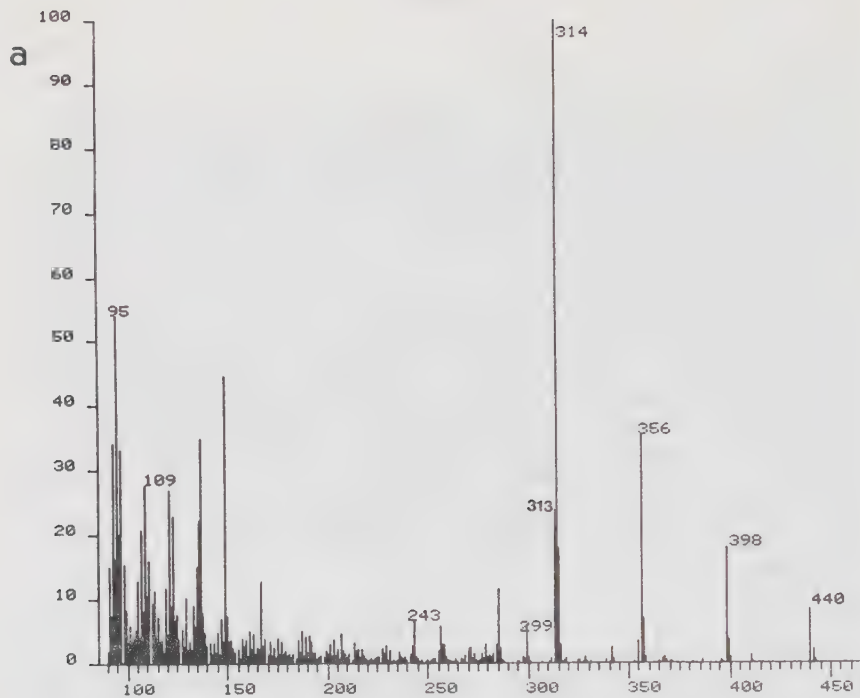


Abb. 27: Massenspektren von E2-Acetat (a, oben) und E3-Acetat (b, unten)

Tabelle 16: Fragmentationen im MS und ihre Zuordnung

m/z (rel. Int. %)	Zuordnung
<u>E2</u>	
314 (100)	M ⁺ (Molekülion)
299 (22)	M - 15 (CH ₃)
243 (31)	M - 15 (CH ₃) - 56 (CO-CO)
<u>E3</u>	
300 (100)	M ⁺ (Molekülion)
<u>E2-Acetat</u>	
440 (8)	M ⁺ (Molekülion)
398 (14)	M - 42 (CH ₂ =C=O, Keten)
356 (35)	M - 84 (2 x Keten)
314 (100)	M - 126 (3 x Keten) (entacetylierte Verbindung E2)
313 (24)	E2 - 1 (H)
299 (5)	E2 - 15 (CH ₃)
243 (7)	E2 - 15 (CH ₃) - 56 (CO-CO)
<u>E3-Acetat</u>	
468 (6)	M ⁺ (Molekülion)
426 (19)	M - 42 (Keten)
384 (36)	M - 84 (2 x Keten)
342 (59)	M - 126 (3 x Keten)
300 (100)	M - 168 (4 x Keten) (entacetylierte Verbindung E3)
299 (29)	E3 - 1 (H)
271 (9)	E3 - 1 (H) - 28 (CO)
243 (6)	E3 - 1 (H) - 56 (CO-CO)

2.5.2.4. ^1H -NMR-Spektroskopie

Die 80 MHz ^1H -NMR-Spektren von E2-Acetat und E3-Acetat wurden in CDCl_3 aufgenommen.

Das Spektrum von E2-Acetat bestätigte, daß drei Acetatgruppen und eine Methoxygruppe sowie vier aromatische Protonen vorlagen (Abb. 29 und Tabelle 17).

Zwei der vier aromatischen Protonen erschienen als Dubletts mit der für meta-ständige Protonen typischen Kopplungskonstanten von 2 Hz. Aufgrund ihres Erscheinens als scharfe Singulett mußten die anderen beiden Protonen zueinander para-ständig stehen. (s. Abb. 29).

BICKOFF und Mitarb. (166,185) fanden, daß im ^1H -NMR-Spektrum von Coumestanen die Signale von H-5 und H-10 gegenüber den übrigen aromatischen Protonen deutlich nach tieferem Feld verschoben sind.

Demnach stammte das bei 7,9 ppm registrierte Singulett entweder vom H-5 oder vom H-10. Das Spektrum ließ also folgende zwei Möglichkeiten zu:

1. Dieses Proton war das H-5. Dann mußte das Singulett bei 7,52 ppm vom H-8 stammen und die meta-ständigen Protonen waren H-11 und H-13.
2. Es handelte sich um das H-10. Dann sollte das andere Singulett vom H-13 kommen und die meta-koppelnden Protonen waren H-6 und H-8.

Ging man von der Wedelolacton-Struktur aus, so kam nur die zweite Möglichkeit in Frage. Das Signal bei 6,73 ppm stammte dann vom H-6 und das bei 6,93 ppm vom H-8 (166).

Die ähnliche chemische Verschiebung von H-8 in den ebenfalls C7- OCH_3 -substituierten Coumestanderivaten Glycyroldiacetat (6,98 ppm (175)) und 5,7-Dimethoxy-6-acetoxy-11,12-methylenedioxy-coumestan (6,86 ppm (181)) (beide in CDCl_3) sprachen für die getroffene Zuordnung. Auch die übereinstimmenden chemischen Verschiebungen von H-10 und H-13 von 7,11,12-Triacetoxycoumestan mit einer zu Wedelolactonperacetat identischen Substitution am Ring B erhärtete diese Annahme.

Da jedoch nach Literaturangaben (z.T. wurden andere Lösungsmittel verwendet, s. z.B. bei (166)) die erste Möglichkeit nicht auszuschließen war, wurde noch durch Vergleich mit einer von HALIM (158) zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung gestellten Vergleichssubstanz bewiesen, daß E2 mit Wedelolacton identisch war (vergleichende DC in LM I und II, auch HPTLC- und RP18-Platten; vergleichende HPLC (u.a. TS I und II); identische Schmelzpunkte).

E2 war also 5,11,12-Trihydroxy-7-methoxycoumestan (Wedelolacton). Diese Verbindung war bereits 1956 von GOVINDACHARI und Mitarb. aus *Wedelia calendulacea* isoliert worden ((204,205), s. Kapitel 4B).

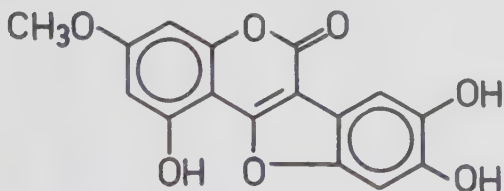


Abb. 28: Struktur von Wedelolacton (E2)

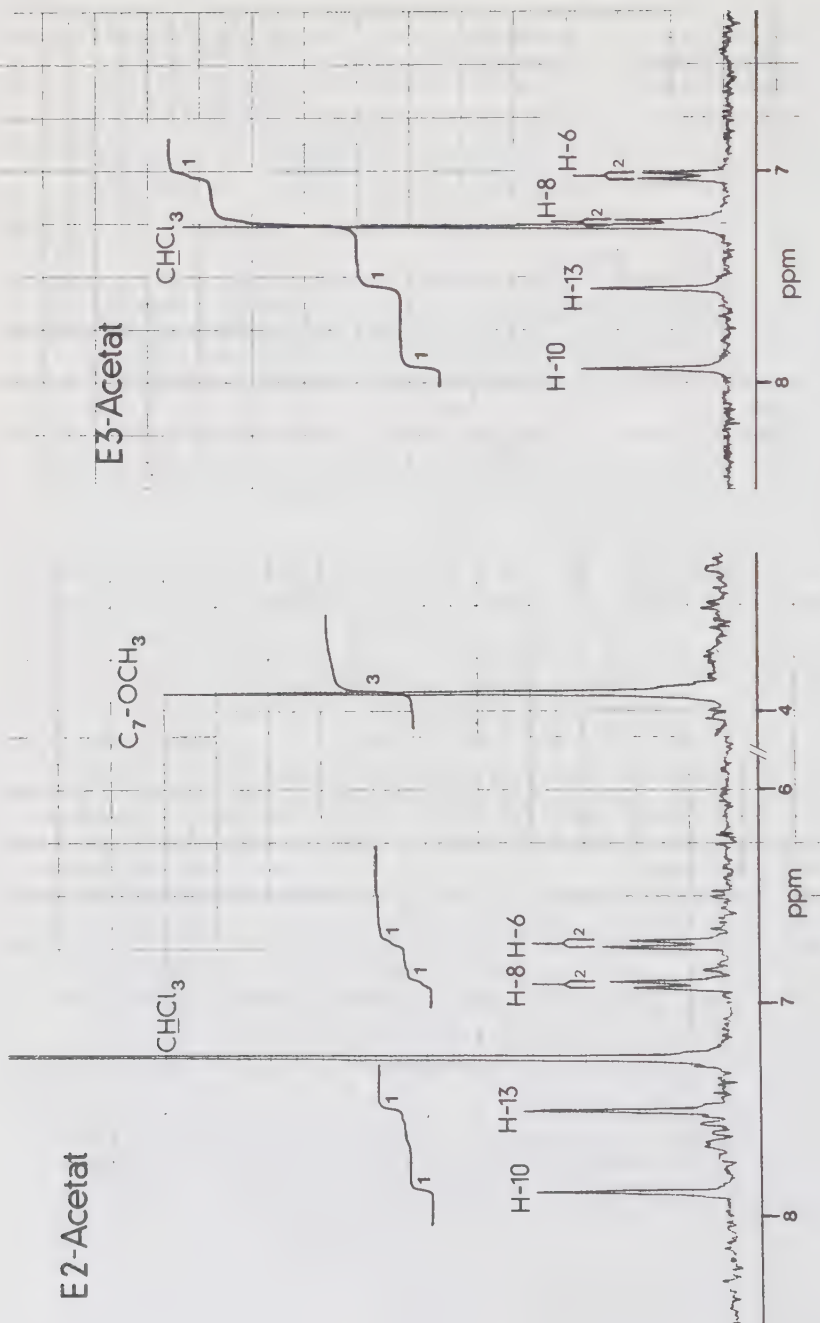


Abb. 29: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren von E2-Acetate (links) und E3-Acetate (rechts)

Tabelle 17: ^1H -NMR-Daten der nicht aromatischen Protonen von E2-Acetat und E3-Acetat

	Signal (ppm)	Spinzustand	Integration	Zuordnung
<u>E2-Acetat</u> :	2,33	Singulett	6 H	2 $\text{CH}_3\text{-CO-O-}$
	2,50	"	3 H	1 $\text{CH}_3\text{-CO-O-}$
	3,91	"	3 H	$\text{C}_7\text{-OCH}_3$
<u>E3-Acetat</u> :	2,35	Singulett	9 H	3 $\text{CH}_3\text{-CO-O-}$
	2,50	"	3 H	1 $\text{CH}_3\text{-CO-O-}$

Übereinstimmend mit der Desmethylwedelolactonperacetat-Struktur waren im Spektrum von E3-Acetat vier Acetoxygruppen (Tabelle 17) und vier aromatische Protonen zu erkennen (Abb. 29).

Aufgrund der zu Wedelolacton identischen Substitution im Ring B entsprachen H-10 und H-13 in ihren chemischen Verschiebungen den entsprechenden Protonen von Wedelolactonperacetat (Singuletts bei 7,94 und 7,55 ppm, s. Abb. 29).

Die endgültige Bestätigung der Desmethylwedelolactonperacetat-Struktur erfolgte durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der A-Ring-Protonen von E2- und E3-Acetat.

Nach (166) verschieben sich bei Coumestanen die Resonanzsignale der Protonen, die zu einer Methoxygruppe ortho-ständig stehen, um 0,28 bis 0,35 ppm nach tieferem Feld bei Substitution der $\text{OCH}_3\text{-}$ durch eine Acetat-Gruppe, vorausgesetzt, die Struktur bleibt anderweitig gleich und man verwendet dasselbe Lösungsmittel. Die meta-ständigen Protonen sind entsprechend um 0,12 bis 0,14 ppm und die in para-Stellung um 0,22 bis 0,28 ppm verschoben.

Die zur Methoxygruppe von Wedelolactonacetat (am C7) ortho-ständigen Protonen waren im Spektrum von E3-Acetat vergleichsweise um 0,3 ppm (H-6) und 0,32 ppm (H-8) verschoben. Der Shift dieser beiden Dubletts der A-Ring-Protonen bewies eindeutig die Identität von E3-Acetat mit Desmethylwedelolactonperacetat (5,7,11,12-Tetraacetoxycoumestan) (Abb. 30).

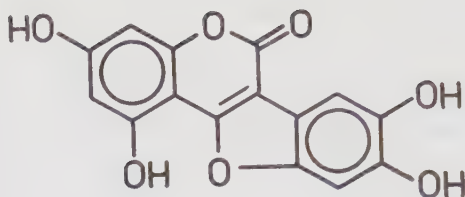


Abb. 30: Struktur von Desmethylwedelolacton (E3)

Damit war uns zum ersten Mal die Isolierung dieser beiden Coumestane aus getrocknetem Drogenmaterial gelungen. KRISHNAS-WAMY und Mitarb. hatten mehrfach berichtet, daß getrocknete Blätter von *Eclipta alba* weder Wedelolacton noch Desmethylwedelolacton enthielten und daß die Coumestane nur aus der frischen Droge isoliert werden konnten (31,160,161). Sie vermuteten, daß die Coumestane durch Oxidation während des Trocknungsprozesses abgebaut werden. Diese Feststellung konnte von uns eindeutig widerlegt werden.

Ließ man dagegen die Coumestane einige Zeit in alkoholischer Lösung stehen, konnte man im DC-Bild eine zusätzliche Zone beobachten, die in allen verwendeten Laufmitteln am Start verblieb. In der HPLC ließen sich entsprechend drei zusätzliche Peaks mit kürzeren Retentionszeiten detektieren. Dieses Verhalten ist sehr wahrscheinlich auf die leicht oxidierbare ortho-Dihydroxygruppe zurückzuführen. Offenbar wegen der leichten Oxidierbarkeit der beiden Coumestane sind auch alle unsere Versuche, sie für eine Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren, bisher fehlgeschlagen.

2.6. Coumestanvorkommen in Pflanzen

Coumestane gehören zur Gruppe der Isoflavonoide, die eine sehr begrenzte Verteilung im Pflanzenreich haben: etwa 90% aller bisher bekannten Isoflavonoide kommen in der Unterfamilie Papilionoideae der Leguminosae vor (167,193).

Außerhalb der Leguminosae sind Coumestane außer in *Eclipta alba* und *Wedelia calendulacea* (Kap. 4B) (Asteraceae) bisher nur in zwei weiteren Familien aufgefunden worden: Coumestrol in *Brassica oleracea* (Cruciferae) und *Spinacia oleracea* (Chenopodiaceae) (193).

Insgesamt sind mindestens 30 natürlich vorkommende Coumestane bekannt. Allein aus *Medicago sativa* (Alfalfa) und *Trifolium repens* wurden 11 Vertreter dieser Gruppe isoliert. Neben 18 einfachen Coumestanen kennt man 10 komplexe Coumestane und zwei Coumestanglykoside: Coumestrol-O-glucosid und Desmethylwedelolacton-7-O-glucosid (193). Allerdings konnte das Vorkommen dieser letztgenannten Verbindung in *Eclipta alba* (160,161) weder von HALIM (158) noch von uns bestätigt werden.

Obwohl die Bildung einiger Coumestane durch pathogene Mikroorganismen induziert wird, sind Coumestane keine Phytoalexine, da ihnen eine antibakterielle oder fungitoxische Wirkung fehlt. Nach der Literatur sind sie jedoch als Stressmetaboliten anzusehen (193).

Übersichten über die Coumestane und andere Isoflavonoid-Klassen geben MABRY (109), BICKOFF (166), WONG (167) und INGHAM (193).

2.7. HPLC-Untersuchungen

2.7.1. Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion

Die HPLC-Auftrennung der EtOAc-Fraktion gelang mit einer μ -Bondapak C18-Säule und einem Gradientensystem (18-40% Acetonitril, 2% Essigsäure, TS III, s. Exp. Teil IV. 2.7.).

Eine optimierte Trennung wurde durch den Einsatz einer LiChrospher RP18-Säule und des linearen Gradienten 15-40% Acetonitril (mit Phosphorsäure, TS IV) erhalten. Abb. 31 zeigt das bei 254 nm detektierte HPLC-Chromatogramm und die on-line registrierten UV-Spektren der Peaks (Photodiodenarray-Detektion).

Sowohl durch die UV-Spektren als auch durch Vergleich der Retentionszeiten und Überspritzen mit isoliertem E1, E2 und E3 sowie authentischem Apigenin und Wedelolacton konnten im Fingerprint die Peaks g, h und i zugeordnet werden (Abb. 31).

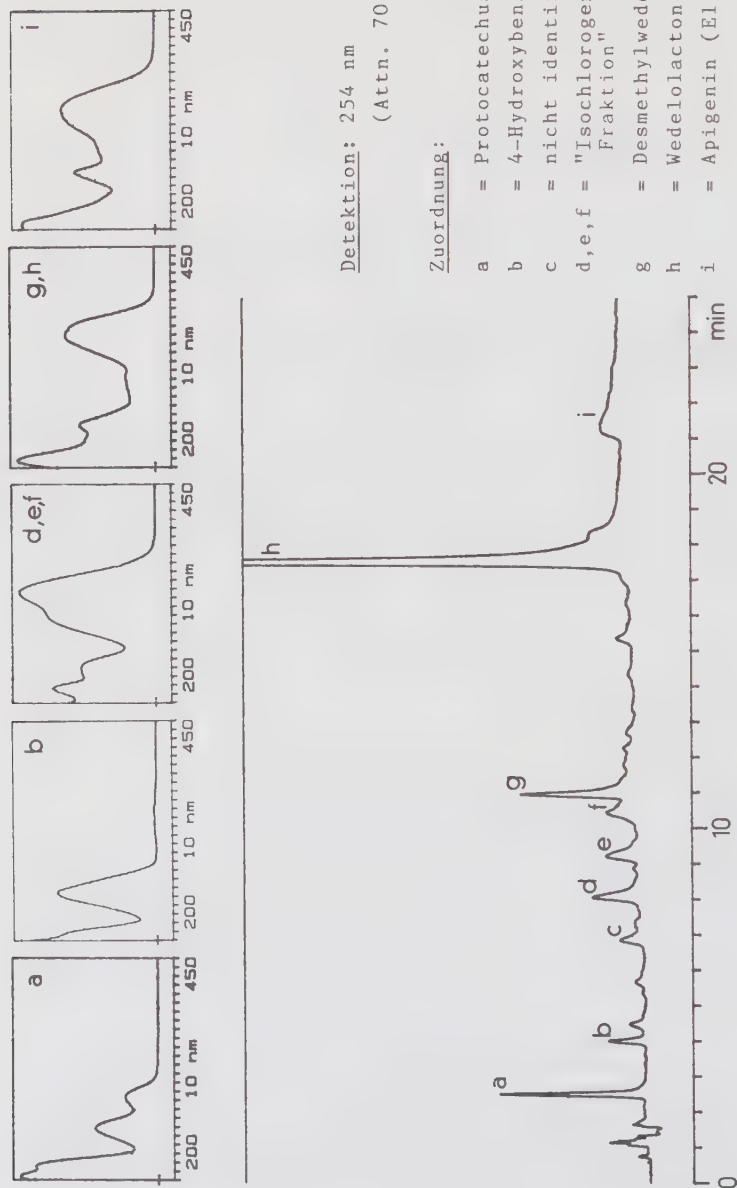


Abb. 31: HPLC-Chromatogramm der Ethylacetat-Fraktion von *Eclipta alba* und UV-Spektren der Hauptpeaks (TS IV, s. Exp. Teil IV. 2.7.)

Wedelolacton war die Hauptverbindung der Fraktion.

Die "Peakreinheit" aller Hauptpeaks wurde durch die Aufnahme der UV-Spektren an der Spitze sowie an der auf- und absteigenden Flanke der jeweiligen Peaks bestätigt (deckungsgleiche Spektren).

2.7.2. Identifizierung von Phenolcarbonsäuren

2.7.2.1. Hydroxybenzoesäuren

Das UV-Spektrum von Peak a entsprach dem einer 3,4-substituierten Hydroxybenzoesäure und das von Peak b war charakteristisch für eine para-substituierte Phenolcarbonsäure ((190), s. Kap. 5 und 6). Durch Überspritzen mit verschiedenen Phenolcarbonsäuren konnten Peak a als Protocatechusäure und Peak b als 4-Hydroxybenzoesäure identifiziert werden (TS II und V).

Die Identifizierung von Protocatechusäure erklärte, warum die Zone E2 in LM I ein Gemisch darstellte (s. Abb. 22 und S. 67). Protocatechusäure hat in diesem Laufmittel einen mit Wedelolacton übereinstimmenden Rf-Wert.

Das Vorkommen dieser beiden Pflanzensäuren in *Eclipta alba* ist bisher noch nicht beschrieben worden.

2.7.2.2. Hydroxyzimtsäureester

Die UV-Spektren der Peaks d, e und f waren identisch und entsprachen denen von einfachen Hydroxyzimtsäuren (190). Vergleichende DC- und HPLC-Untersuchungen brachten jedoch keine Klärung.

Da nach alkalischer Hydrolyse der Fraktion Kaffeesäure nachzuweisen war (LM I), mußten die Peaks d, e und f von Kaffeesäureestern stammen.

DC-Untersuchungen ergaben eine Übereinstimmung der Zonen E4 und E5 (Abb. 22) der EtOAc-Fraktion mit der Vergleichssubstanz "Isochlorogensäuren", die in LM I und V zwei Hauptzonen ausbildete.

Nach HERRMANN handelt es sich bei den Isochlorogensäuren um ein Gemisch mehrerer DicaFFEYL-chinasäuren: 3,4-, 3,5- und 4,5-Di-O-caffeyl-D-chinasäure. Aus jeder einzelnen Verbindung kann leicht ein Gemisch der drei Isomeren in etwa gleichem Verhältnis entstehen, da diese Verbindungen sehr leicht der Umesterung unterliegen. Die Bezeichnung "Isochlorogensäure-Fraktion" sollte bevorzugt werden, wenn keine genaue Identifizierung der einzelnen Komponenten möglich ist (190-192).

In der HPLC wurden käufliche "Isochlorogensäuren" in TS IV chromatographiert. Wir erhielten das in Abb. 32 gezeigte Chromatogramm. Die Retentionszeiten und UV-Spektren von Peak 2, 3 und 5 stimmten mit denen von Peak d, e und f überein (Rt 7,6, 8,7 und 9,8 min). Damit war das Vorliegen einer "Isochlorogensäure-Fraktion" in der EtOAc-Fraktion von *Eclipta alba* wahrscheinlich.

Bei den anderen Peaks könnte es sich um die durch UV-Licht bei der Lagerung entstandenen cis-Isomere handeln, die sich in ihren Retentionszeiten z.T. beträchtlich von den trans-Isomeren unterscheiden (192).

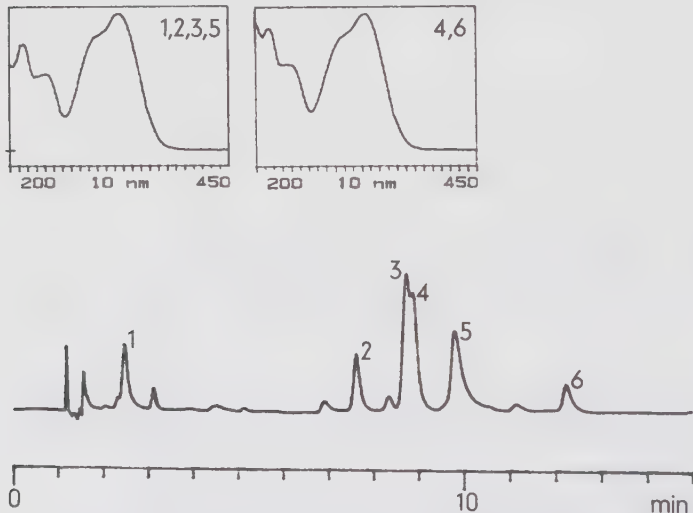


Abb. 32: HPLC-Chromatogramm der "Isochlorogensäuren" und UV-Spektren der Hauptpeaks (TS IV, 351 nm)

2.7.3. Quantitative Bestimmung der Coumestane

Wir untersuchten den Gehalt an Wedelolacton und Desmethylwedelolacton in der bisher bearbeiteten EtOAc-Fraktion (=EtOAc 1) sowie einer Fraktion aus einer neuen Drogencharge (=EtOAc 2) und einer Fraktion, bei der die Abtrennung der Ballaststoffe auf etwas schonendere Weise durchgeführt wurde (=EtOAc 3) (s. Exp. Teil IV. 2.2., 2.8.2. und 2.8.3.).

Die genaue Integration der Peakfläche wurde erschwert durch das trotz Säurezusatzes zum Fließmittel auftretende starke Peak tailing und das Auftreten eines weiteren, auf dem Peak-"Tail" aufsitzenden kleinen Peaks. Diese Schulter war bei den Coumestan-Peaks in den Chromatogrammen der EtOAc-Fraktion (Abb. 31), der eingespritzten isolierten Reinsubstanzen, der Wedelolacton-Vergleichssubstanz und eines synthetisierten Wedelolactons (201) immer vorhanden. Da jedoch die Vergleichssubstanz (158) im Gegensatz zum isolierten Wedelolacton (E2) keine weitere Schulter vor dem Wedelolacton-Peak hatte, verwendeten wir diese als Eichsubstanz.

Die Eichgerade wurde durch Einspritzen unterschiedlicher Mengen einer 0,05%igen Eichlösung von Wedelolacton erstellt. Detektiert wurde bei 351 nm, dem langwelligen Hauptmaximum der Coumestane. Im Bereich von 0,5 bis 5 µg bestand ein lineares Verhältnis zwischen der eingespritzten Menge und der Peakfläche von Wedelolacton (Abb. 33).

Die der integrierten Fläche entsprechende Menge an Wedelolacton wurde errechnet nach folgender mit Hilfe eines Computerprogramms (lineare Regression) erstellten Gleichung:

$$x = 0,0455 + 0,1988 y$$

(Standardabweichung: 0,072

Korrelationskoeffizient: 0,9995)

x = Menge Wedelolacton (µg)

y = Flächeneinheiten

Da Desmethylwedelolacton ein fast gleiches Molekulargewicht und denselben Chromophor wie Wedelolacton besitzt, kann die Eichgerade auch zur approximativen Bestimmung von Desmethylwedelolacton verwendet werden.

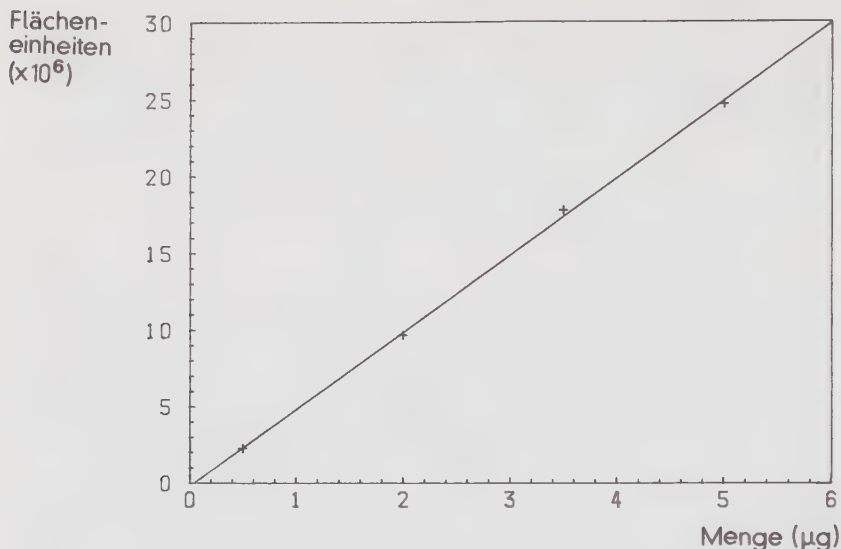


Abb. 33: Eichgerade von Wedelolacton

Die einzelnen Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Die im Vergleich zur quantitativen Bestimmung von Isobutrin (Kap. 3, 4.2.) höhere relative Standardabweichung bei der Bestimmung von Wedelolacton ist auf die erörterten Schwierigkeiten bei der Integration der Coumestan-Peaks zurückzuführen (s. Exp. Teil IV. 2.8.).

Die beiden Drogenchargen unterschieden sich besonders im Gehalt an Desmethylwedelolacton. In EtOAc 2 (2. Charge) war etwa dreimal so viel Desmethylwedelolacton enthalten wie in EtOAc 1 bzw. 3 (1. Charge).

Im Gehalt an Wedelolacton unterschieden sich die Chargen dagegen wenig. Es stellte sich jedoch heraus, daß das leicht modifizierte Anreicherungsverfahren zu einem erhöhten Gehalt an Wedelolacton führte (21% in EtOAc 3, 16% in EtOAc 1 aus derselben Drogencharge).

Tabelle 18: Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der Coumestane
in verschiedenen EtOAc-Fractionen aus *Eclipta alba*

Fraktion	Best.	Menge Frakt. (µg)	Flächen- einheiten (x10 ⁶)*	Menge Coumestan (µg)**	Gehalt (%)***
EtOAc 1	1	3	W: 2,1993	0,483	16,1
			D: 0,3375	0,113	3,8
	2	5	W: 3,8455	0,810	16,2
			D: 0,6961	0,184	3,7
	3	10	W: 7,5160	1,540	15,4
			D: 1,2706	0,298	3,0
W: $\bar{x} = \underline{15,9}$ (s _{rel.} = 2,74%)					
D: $\bar{x} = \underline{3,5}$					
EtOAc 2	1	3	W: 2,4663	0,536	17,9
			D: 1,6195	0,368	12,3
	2	5	W: 4,0308	0,847	16,9
			D: 2,4961	0,542	10,8
	3	10	W: 7,7179	1,580	15,8
			D: 4,6520	0,970	9,7
W: $\bar{x} = \underline{16,9}$ (s _{rel.} = 2,59%)					
D: $\bar{x} = \underline{10,9}$					
EtOAc 3	1	3	W: 3,0551	0,653	21,8
			D: 0,3959	0,124	4,1
	2	5	W: 5,1163	1,063	21,3
			D: 0,5307	0,151	3,0
	3	10	W: 10,2020	2,074	20,7
			D: 1,3128	0,307	3,1
W: $\bar{x} = \underline{21,3}$ (s _{rel.} = 6,22%)					
D: $\bar{x} = \underline{3,4}$					

* W: Wedelolacton (Rt 17,5 min)
D: Desmethylwedelolacton (Rt 11 min)

** Berechnet nach Gleichung von S. 87

*** Bezogen auf das Trockengewicht der EtOAc-Fraktion

Der HPLC-Fingerprint von EtOAc 3 unterschied sich nur geringfügig von dem von EtOAc 1 (Abb. 31). Bei $R_t = 5,7$ min erschien ein zusätzlicher, kleiner Peak mit dem UV-Spektrum eines Flavons. Der Fingerprint von EtOAc 2 entsprach dem von EtOAc 1.

Zur Ermittlung des Wedelolactongehalts in der Droge verwendeten wir einen Methanolextrakt. Eine methanolische Lösung wurde zur Entfernung der lipophilen Bestandteile durch eine SepPak-Kartusche filtriert. 20 μ l dieser Lösung wurden direkt in die HPLC eingespritzt. Wir erhielten das in Abb. 34 gezeigte Chromatogramm.

Nach Integration der Peakfläche errechneten wir einen Gehalt von 1,6% Wedelolacton (bezogen auf das Trockengewicht des MeOH-Extraktes). Das entspricht etwa einem Gehalt von 0,2% Wedelolacton in der Droge.

Der "Peak" von Desmethylwedelolacton konnte nicht integriert werden.

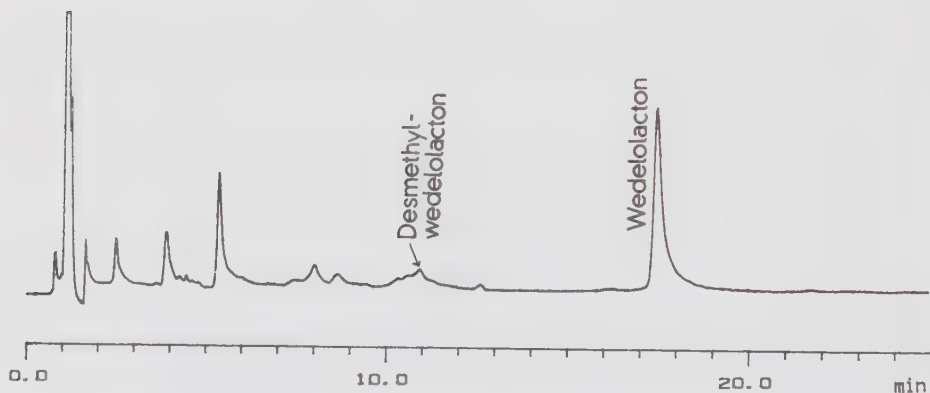


Abb. 34: HPLC-Fingerprint des Methanolextraktes von *Eclipta alba* (TS IV, Detektion bei 351 nm)

3. Pharmakologische Untersuchungen

3.1. Hepatozyten-Test

3.1.1. Ergebnisse

Als Bestandteile der stark antihepatotoxisch wirkenden EtOAc-Fraktion (hier ist immer EtOAc 1 gemeint; s. Tab. 14, S. 68) wurden die Hauptverbindung Wedelolacton sowie Desmethylwedelolacton und Apigenin getestet. Außerdem testeten wir Luteolin, das in den beiden von uns untersuchten Chargen von *Eclipta alba* nicht nachweisbar war, jedoch nach (158) in dieser Pflanze vorkommen soll. Zum Vergleich wurden noch ein von HALIM (158) zur Verfügung gestelltes isoliertes sowie ein synthetisiertes Wedelolacton (201) im Test auf ihre antihepatotoxische Wirkung hin untersucht. Die Wirkungen von Protocatechusäure und 4-Hydroxybenzoesäure in diesem Testmodell werden in den Kapiteln 5 und 6 besprochen.

Aus dem Test geht eindeutig hervor, daß die Coumestane Wedelolacton und Desmethylwedelolacton die Wirkprinzipien der EtOAc-Fraktion sein müssen. Die beiden isolierten Coumestane waren sowohl im CCl_4 - als auch im GalN-Schädigungsmodell sehr stark aktiv (s. Tabelle 19).

Diese Wirkung ließ sich mit dem als Testsubstanz zur Verfügung gestellten und dem synthetischen Wedelolacton reproduzieren (vgl. Werte für 1 mg/ml). Auffällig war, daß das synthetische Wedelolacton bereits in einer Dosis von 0,1 mg/ml hochaktiv war. Da sich diese Verbindung aufgrund von DC- und HPLC-Untersuchungen und ihrer Spektren (MS und ^1H -NMR) jedoch nicht als völlig rein erwies, ist nicht auszuschließen, daß diese erhöhte Aktivität auf reaktive Zwischenprodukte aus der Synthese zurückzuführen ist. Dies bedarf noch weiterer Klärung.

Die Wirkung von Wedelolacton war im CCl_4 -Modell ausgeprägter als im GalN-Schädigungsmodell. Im Kontrollversuch reduzierte Wedelolacton die GPT-Aktivität im Standardmedium auf 44% der Kontrolle (Dosis: 1 mg/ml, GPT-Aktivität: 476 ± 15 U/l (Kontrolle) und 210 ± 5 U/l (Wedelolacton), $n=3$, $p<0,001$). Diese relativ starke direkte enzyminhibitorische Aktivität des Coumestans erklärt jedoch nicht die im Test erzielte hochsignifikante Ver-

Tabelle 19: Antihepatotoxische Wirkung von Substanzen aus *Eclipta alba* im Hepatozyten-Test

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100	100
Wedelolacton (E2)	0,01	55±1*	118±3
	0,1	67±2*	104±1
	1,0	8±1*	19±9*
angereicherte E3-Fraktion	1,0	7±2*	25±1*
Desmethylwedelolacton (E3)	0,01	100±7	94±1
	0,1	81±3	69±3*
	1,0	6 ^a	10 ^a
Apigenin (E1)	0,01	109±3	99±3
	0,1	107±3	92±2
	1,0	111±0	98±1
Luteolin	0,01	115±2	96±5
	0,1	104±2	88±3
	1,0	48±3*	64±0*
Wedelolacton (158)	1,0	0 ^a	9 ^a
Wedelolacton (synthetisiert nach (201))	0,01	91±3	114±11
	0,1	38±2*	47±1*
	1,0	8±0*	3±1*

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, wirksam, $p < 0,001^*$, $n=3$ oder $n=2^a$.

ringierung der GPT-Spiegel auf z.T. unter 10% der Kontrollen.

In der Literatur ist die enzyminhibitorische Aktivität einiger Isoflavonoide beschrieben (193). Hinweise auf eine enzyminhibitorische Wirkung von Coumestanen konnten wir dagegen nicht finden.

Bereits die nach Säulenchromatographie erhaltene stark angereicherte E3-Fraktion war ausgeprägt wirksam. Desmethylwedelolacton zeigte wie Wedelolacton in beiden Testmodellen eine etwa gleich starke und dosisabhängige Wirkung. Dieses Coumestan war in einer Dosis von 0,1 mg/ml gegen GalN-induzierte und schwächer auch gegen CCl₄-induzierte Hepatotoxizität wirksam.

Im Kontrollversuch mit dieser Dosis zeigte Desmethylwedelolacton keine direkte enzyminhibitorische Aktivität (102% der Kontrollen).

Das Flavon Apigenin war weder gegen CCl_4 - noch gegen GalN-induzierte Zytotoxizität wirksam. Luteolin war zwar in der höchsten Dosis aktiv, reduzierte jedoch im Kontrollversuch die GPT-Aktivität auf 31% der Kontrolle. Man muß daher davon ausgehen, daß Luteolin in diesem Test nicht oder nur wenig antihepatotoxisch wirkt.

3.1.2. Vergleichende Beurteilung und Diskussion der Ergebnisse

Im Arbeitskreis von HIKINO sind weit über 200 Naturstoffe bzw. analoge synthetische Verbindungen und Derivate aus über zehn verschiedenen Naturstoffklassen getestet worden (s. Tabelle 2, S. 9-11 und (197,198)). Nur wenige dieser Verbindungen zeigten in einem oder beiden dieser Testmodelle eine mit den Coumestanen vergleichbar starke Verringerung der Transaminaseaktivität auf weniger als 20% der Kontrollen (bei 1 mg/ml).

Dazu gehören z.B. Capillarisin und Esculetin (20), Eupafolin (= Nepetin (83)), 18- β -Glycyrrhetinsäure (38,59), Kaffeesäure, (GalN-Modell (28)), Silymonin und Silandrin (GalN-Modell (142)), Curcumin (CCl_4 -Modell (28)), einige Lignane aus *Schizandra chinensis* (CCl_4 -Modell (49)), einige Gerbstoffe und Gerbstoffbausteine (z.B. Penta-O-galloylglucose, 1,2,3,6-Tetragalloylglucose, die Ellagitannine Corilagin, Tellimagrandin I und II, Geraniin und Rugosin A und C sowie Epicatechingallat und Epigallocatechingallat, CCl_4 -Modell (197)) und einige synthetische Diphenylheptanoide (GalN-Modell (198)). Einschränkung muß bemerkt werden, daß z.T. von diesen Verbindungen die Ergebnisse des Kontrollversuchs nicht vorliegen. Einige der stark aktiven Verbindungen, wie z.B. die meisten Gerbstoffe, haben gleichzeitig sehr ausgeprägte enzyminhibitorische Eigenschaften.

Nur die vier erstgenannten Verbindungen waren in beiden Schädigungsmodellen etwa so aktiv wie die Coumestane. Damit gehören Wedelolacton und Desmethylwedelolacton zu den wirksamsten aller bisher getesteten Verbindungen.

Die in diesem Test bemerkenswert aktiven Verbindungen gehören sehr verschiedenen Stoffklassen an, es sind Flavonoide, Cumarine, Triterpensaponine, Lignane und Phenolcarbonsäuren.

Auffällig ist, daß sie sehr häufig eine phenolische ortho-Dihydroxygruppe haben, wie z.B. Kaffeesäure, Eupafolin, Epicatechingallat und einige synthetische Hydroxydiphenylheptanoide. Auch die Coumestane aus *Eclipta alba* weisen diese Gruppierung auf.

Aufgrund ihrer Radikalfänger-Eigenschaften können Verbindungen mit dieser Teilstruktur die Lipidperoxidation hemmen, wie es z.B. für Flavonoide (199) und Catechol- bzw. Pyrogallol-Derivate (200) beschrieben ist.

Die antihepatotoxische Wirkung solcher Verbindungen gegen CCl_4 -induzierte Schäden hängt möglicherweise mit der antioxidativen Wirkung zusammen (199,208). Dadurch kann jedoch nicht die Aktivität der Coumestane und anderer Verbindungen gegen GalN -induzierte Schädigungen erklärt werden, da der Schädigungsmechanismus von GalN nicht auf der Bildung von Radikalen beruht (s. S. 18).

Es gibt auch einige Beispiele von Verbindungen, die starke Aktivität im Hepatozyten-Test zeigen und diese Gruppierung nicht haben, z.B. Glycyrrhetinsäure (38), Silymonin (142), Umbelliferon (20) oder die Schizandra-Lignane (49). Außerdem existieren einige Beispiele von Verbindungen, die diese Teilstruktur aufweisen und dennoch im Test nur schwach aktiv sind mit Werten über 75% GPT, z.B. Catechin (197), Protocatechusäure (Kap. 5 und 6), Eupatolitin (20) und Homoorientin (53). Daher muß die Grundstruktur eine wichtige Rolle für die antihepatotoxische Aktivität spielen. Als Wirkmechanismus wäre z.B. ein stabilisierender Effekt auf die Zellmembran zu diskutieren, was durch Messung von Membranaffinitäten belegt werden könnte.

Zur Klärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Coumestanen bedarf es weiterer Untersuchungen. Wedelolacton und Desmethylwedelolacton sind die ersten Coumestane, die getestet worden sind. Interessant in diesem Zusammenhang wären Coumestane, die am Ring B keine ortho-Dihydroxygruppe haben, wie es bei allen weiteren bekannten Coumestanen der Fall ist.

Die Aktivität der EtOAc-Fraktion korreliert nicht mit dem Gehalt an Wedelolacton. Da für Kaffeesäure in diesem Test eine starke Wirkung gefunden wurde (28), ist es möglich, daß die "Isochlorogensäure-Fraktion" zu der Gesamtwirkung der Fraktion beiträgt. Auch Protocatechusäure ist in geringerem Ausmaß an der Wirkung beteiligt (Werte s. Kap. 5). Daher dürfte die sehr starke Wirkung der EtOAc-Fraktion durch ein Zusammenwirken mehrerer Wirkprinzipien zustandekommen, wobei allerdings den Coumestanen nach den bisherigen Ergebnissen die Hauptwirkung zukommen sollte.

In der Gruppe der Isoflavonoide sind Verbindungen mit fungitoxischen, antibakteriellen und nematostatischen Eigenschaften bekannt. Außerdem sind vereinzelt weitere, sehr diverse pharmakologische und biologische Eigenschaften der Isoflavonoide beschrieben worden. Sie haben z.B. insektizide, hämolytische, antiinflammatorische, diuretische, hypotensive und Antitumor-Aktivität (193).

Bei den Coumestanen kennt man bisher hauptsächlich ihre Wirkung als Östrogene. Die östrogene Aktivität von Coumestrol war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (166,172,183,193). Coumestrol und andere Isoflavone, wie Formononetin, Genistein und Biochanin A, sind enthalten in wichtigen Weidepflanzen wie einigen Kleearten. Bei Schafen und anderen Weidetieren ist die "red-clover disease" auf diese östrogen wirkenden Verbindungen zurückzuführen (Unfruchtbarkeit der weiblichen Tiere). Obwohl Coumestrol normalerweise in geringer Konzentration in den Futterpflanzen vorliegt, können diese Probleme vor allem dann auftreten, wenn die Tiere regelmäßig von durch Krankheiten, Mikroorganismen oder Insekten infiziertem Klee oder Luzerne fressen, da dann eine starke Akkumulierung von Coumestrol und anderen Coumestanen erfolgt (Coumestane sind Streßmetaboliten, s. S. 83).

Wedelolacton soll jedoch nach einer Arbeit von BICKOFF und Mitarb. (183) nicht östrogen wirken. In Übereinstimmung damit zeigten erste Ergebnisse, daß Wedelolacton keinerlei Interaktion mit dem Östradiolrezeptor einging (140).

Für die Klasse der Coumestane gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine antihepatotoxische oder anderweitig hepatotrope Aktivität. Die antihepatotoxische Wirkung der beiden Coumestane aus *Eclipta alba* ist somit der erste Hinweis auf eine Leberwirkung von Vertretern dieser Substanzklasse.

3.2. Phalloidin-Schädigungsmodelle

3.2.1. In vitro-Test nach RAO

Die EtOAc-Fraktion bewirkte in der zum Screening verwendeten Konzentration von 50 μM (entsprechend 11 $\mu\text{g/ml}$ mit dem MG der Hauptverbindung Wedelolacton) eine protektive Wirkung von 88 und 91% (zwei Versuchsreihen) vor Phalloidin-induzierter Bläschenbildung bei Hepatozyten. Aufgrund dieser starken Schutzwirkung wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb. 35).

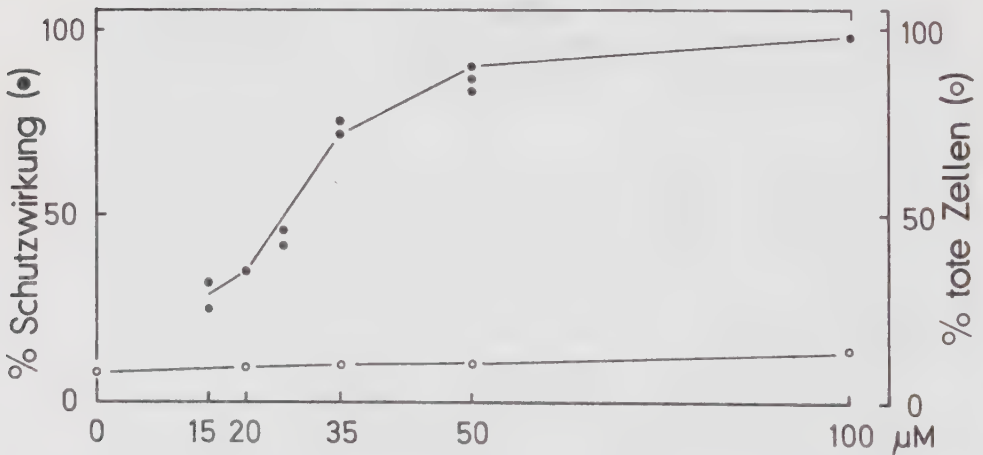


Abb. 35: Effekt der EtOAc-Fraktion auf Phalloidin-induzierte Schädigungen von Hepatozyten

Die Schutzwirkung gegen Phalloidin-induzierte Bildung von Protrusionen an den Zellen stieg dosisabhängig an und erreichte 98% bei 100 μM (31,4 $\mu\text{g/ml}$). Der errechnete CD_{50} -Wert, die Konzentration, bei der ein 50%iger Schutz vor Phalloidin-induzierter Toxizität erzielt wird, lag bei 25,5 μM (8 $\mu\text{g/ml}$).

Über den gesamten Konzentrationsbereich war der Prozentsatz an Hepatozyten, die nach Behandlung mit der EtOAc-Fraktion durch Trypanblau anfärbbar (tot) waren, zwischen 7 und 14% (untere Kurve (o), Abb. 35). Damit war bewiesen, daß die EtOAc-Fraktion

selbst keinen schädigenden Einfluß auf die Hepatozyten ausübte.

Erste Untersuchungen mit Desmethylwedelolacton ergaben nur schwache Schutzwirkungen: 15% bei 20 μM (6 $\mu\text{g/ml}$) und 21% bei 30 μM (9 $\mu\text{g/ml}$). Das Coumestan war damit wesentlich schwächer wirksam als die EtOAc-Fraktion. Die Ergebnisse für Wedelolacton liegen uns noch nicht vor.

3.2.2. In vivo-Test an der phalloidinvergifteten Maus

Die EtOAc-Fraktion, die *in vitro* gegen Phalloidin-induzierte Schäden sehr wirksam war, wurde auch *in vivo* bei Mäusen auf Phalloidin-antagonisierende Wirkung hin untersucht (s. S. 20). Die nachfolgende Abbildung zeigt die Todesraten in Prozent der Gruppentierzahl ($n = 10$) nach Vorbehandlung der Tiere mit drei verschiedenen Dosen der EtOAc-Fraktion (*i.v.*-Applikation).

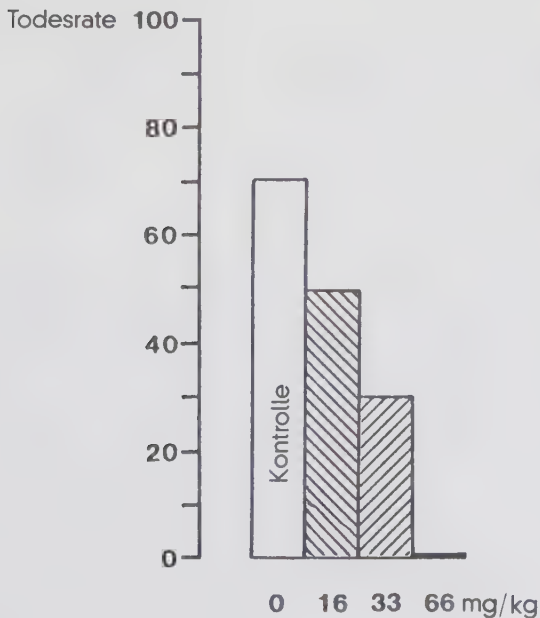


Abb. 36: Effekt der EtOAc-Fraktion auf die phalloidinvergiftete Maus (Todesraten)

Wir fanden auch in diesem Test eine dosisabhängige Schutzwirkung. Nach protektiver Verabreichung der höchsten Dosis (66 mg/kg) starb innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7 Tagen keines der 10 Versuchstiere dieser Gruppe (Phalloidin-Konzentrationen und Lösungsmittel s. Exp. Teil V. 2.2.). Es wurden keine durch die Fraktion ausgelösten Nebenwirkungen beobachtet (92).

Damit scheint die EtOAc-Fraktion aus *Eclipta alba* sowohl in vitro als auch in vivo Phalloidin-antagonistisch zu wirken. Worauf der Wirkungsmechanismus beruht, kann allerdings nach diesen beiden Testen nicht angegeben werden.

3.3. Stimulierung der RNA-Synthese in vitro

In diesem Testmodell wurden die EtOAc-Fraktion in zwei Konzentrationen und Desmethylwedelolacton in einer Konzentration getestet (Abb. 37).

Wie aus der Abbildung hervorgeht, stimulierte die EtOAc-Fraktion sehr stark den Einbau von ^3H -UTP in die RNA der Zellkerne. Erwartungsgemäß war ihre Wirkung bei einer niederen Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$) stärker ausgeprägt (96,140). Auch das Coumestan Desmethylwedelolacton stimulierte den ^3H -UTP-Einbau sehr stark.

Nach 15-minütiger Inkubation ergaben sich die in Tabelle 20 aufgeführten Werte.

Im Vergleich dazu stimulierte Silybin um etwa 20 bis 30% (140). Sowohl die EtOAc-Fraktion wie auch Desmethylwedelolacton stimulierten den ^3H -UTP-Einbau wesentlich stärker als Silybin. Jedoch war die Stimulierung durch die Flavonoide Butrin und Isobutrin aus *Butea monosperma* stärker ausgeprägt im Vergleich zu den *Eclipta*-Substanzen (bei 20 $\mu\text{g/ml}$, s. S. 49-51).

Auch in diesem Test erwies sich die EtOAc-Fraktion als geringfügig wirksamer als das isolierte Coumestan. Allerdings liegen uns die Ergebnisse für Wedelolacton noch nicht vor, so daß eine abschließende Beurteilung noch nicht möglich ist.

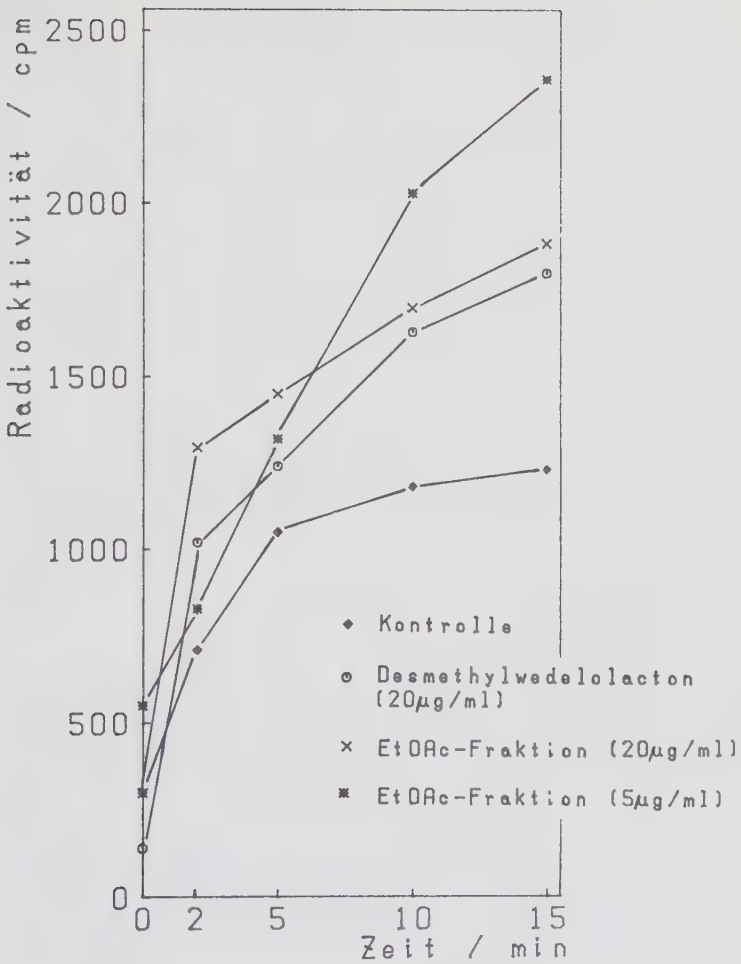


Abb. 37: Zeitverlauf des Einbaus von ^3H -UTP in die RNA von Rattenleberzellkernen in Gegenwart von Substanzen aus *Eclipta alba*

Tabelle 20: Stimulierung des ^3H -UTP-Einbaus in die RNA von Zellkernen nach 15-minütiger Inkubation

Substanz	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	% Steigerung *
EtOAc-Fraktion	20	52,6
	5	88,8
Desmethylwedelolacton	20	45,7

* Bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, denen nur das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen hatte FIEBIG (6) gefunden, daß eine EtOAc-Fraktion die RNA-Synthese in vitro stimulierte (Testmodell mit isolierter Polymerase A (94)).

3.4. In vitro-Inhibition der Prostaglandin- und Leukotrien-Biosynthese

Aus der Volksmedizin lagen zwar keine Hinweise auf eine antiinflammatorische Wirkung von *Eclipta alba* vor, jedoch war aufgrund der Catechol-Struktur der Coumestane eine Hemmwirkung auf die Lipidperoxidation und somit auch eine Inhibition der Arachidonsäure-Peroxidation möglich (187,199,200).

Da sich bei den Screening-Untersuchungen von KIUCHI und Mitarb. zwei "Leberdrogen" auch als potentielle Inhibitoren der Prostaglandinsynthese erwiesen hatten ((182), s.u.) und außerdem von einigen Flavonoiden und anderen phenolischen Verbindungen eine antiinflammatorische Wirkung in vitro bekannt ist, testeten wir in unserem Arbeitskreis die EtOAc-Fraktion und Wedelolacton aus *Eclipta alba* auf ihre Wirkung auf den Arachidonsäure-Stoffwechsel in vitro.

Beim Screening von 162 asiatischen Drogen auf antiinflammatorische Wirkungen wirkten u.a. die Wasserextrakte der "Leberdrogen" *Cyperus rotundus* und *Scutellaria baicalensis* (vgl. Tabelle 1, S.7) inhibitorisch auf ein Prostaglandin-synthetisierendes Enzymsystem (182). Aus *Cyperus rotundus* wurden α -Cyperon und andere Sesquiterpene als potentielle Inhibitoren der Prostaglandinbiosynthese isoliert.

Dieselbe Arbeitsgruppe fand, daß einige Diphenylheptane aus *Alpinia officinarum* und *Alpinia oxyphylla* starke inhibitorische Wirkung auf die PG-Biosynthese in vitro zeigten (186). Diese Verbindungen sowie ähnliche synthetische Diarylheptane waren auch im Hepatozyten-Test z.T. auffallend wirksam (198).

Als in vitro-Inhibitoren der Lipooxygenase und/oder der Cyclooxygenase erwiesen sich einige Flavonoide (z.B. Luteolin, Galangin, 3',4'-Trihydroxyflavon, Quercetin (LO- und CO-Inhibitoren) und 6,7,4'-Trihydroxyisoflavan (selektiver 5-Lipoxygenase-Inhibitor) und andere phenolische Verbindungen (z.B. Eugenol, Thymol, Capsaicin, Curcumin (CO-Inhibitoren, Struktur-Wirkungsbeziehungen s. bei (189)) und Kaffeesäure (5-LO-Hemmstoff)) (187-189,210-212,241,242).

Der Leberwirkstoff Silybin wirkt als in vitro-Inhibitor der Lipooxygenase und Catechin hemmt die Cyclooxygenase in vitro und in vivo (187,194,209).

Als Testsysteme verwendeten wir Cyclooxygenase(CO)- und 5-Lipoxygenase(5-LO)-Präparationen. Dabei wurde die Hemmung der Bildung von Prostaglandinen (CO-Weg) bzw. von Leukotrienen und Hydroxyeicosatetraensäuren (5-LO-Weg) aus Arachidonsäure ermittelt (210,211,241,242).

Bei Screening-Untersuchungen erwies sich die EtOAc-Fraktion aus *Eclipta alba* als starker Inhibitor der 5-LO. Das Coumestan Wedelolacton hatte bereits in sehr niedrigen Konzentrationen eine starke 5-LO-inhibierende Wirkung. Gegen die Cyclooxygenase zeigte das Coumestan in den verwendeten niederen Konzentrationen jedoch keine vergleichbare Wirkung, so daß Wedelolacton ein potenter, selektiver Inhibitor der 5-LO zu sein scheint.

Über diese Ergebnisse wird in zwei anderen Arbeiten aus unserem Arbeitskreis berichtet werden (210,211,242).

Wenn sich Wedelolacton auch in vivo als entzündungshemmend erweisen sollte, wäre diese Verbindung besonders zur Behandlung entzündlicher Lebererkrankungen wie denen des hepatitischen Formkreises geeignet.

So fordert HÄNSEL (135) für einen "idealen" hepatotropen Wirkstoff außer z.B. Antagonismus gegenüber einer Vielzahl von Lebergiften, Förderung der Gewebsregeneration und Radikalfänger-Eigenschaften auch entzündungswidrige Eigenschaften.

KAPITEL 4 B:

UNTERSUCHUNGEN VON WEDELIA CALENDULACEA LESS.

1. Allgemeine Übersicht

Wedelia calendulacea Less. ist mit *Eclipta alba* botanisch sehr eng verwandt. ENGLER (106) ordnet die Gattung *Wedelia* systematisch genauso ein wie die Gattung *Eclipta*. Nach STUESSY (144) gehört die Gattung *Wedelia* Jacq. innerhalb des Tribus *Heliantheae* zur 1. informellen Gruppe des Subtribus *Ecliptinae* Less.

Von der Gattung *Wedelia* gibt es 70 Arten, die in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde beheimatet sind (144). *Wedelia calendulacea* kommt in feuchten Gebieten in Malaysia, China, Ceylon, Australien und Indien vor.

In der Literatur findet man folgende synonyme Bezeichnungen für *Wedelia calendulacea*: *Verbesinia calendulacea* L., *Solidago chinensis* Osbeck, *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., *Jaegeeria calendulacea* W. und *Eclipta erecta* Linn. (16,31,145-147)

Als einheimischer Name für *Wedelia calendulacea* ist "Bhim-raj" gebräuchlich (203). Die Bezeichnungen "Bhringaraja" und "Bhangra" werden außer für *Eclipta alba* (s. S. 60) auch für *Wedelia calendulacea* volkssprachlich verwendet, wobei letztere Pflanze "Pila Bhangra" (gelbblühende Art) ist.

Wedelia calendulacea ist ein mehrjähriges Kraut mit gegenständig angeordneten, lanzettlichen Blättern, die 20-70 mm lang und 6-12 mm breit sind. Die Blätter sitzen entweder direkt an den meist niedergestreckten, an den Nodien bewurzelten Stengeln, oder sie haben kurze Stiele.

Die auf den 60-120 mm langen Stielen sitzenden Blütenköpfchen messen 20-25 mm im Durchmesser und sind vereinzelt endständig an aufrechten Zweigen zu finden. *Wedelia calendulacea* blüht gelb (145,147).

Eine Habituszeichnung oder eine Abbildung der Pflanze konnten wir in der uns zugänglichen Literatur nicht finden.

Die enge taxonomische Verwandtschaft zu *Eclipta alba* Hassk. und die fehlende volkssprachliche Unterscheidung zwischen beiden Pflanzen sind der Grund für den häufigen Ersatz von *Wedelia calendulacea* durch *Eclipta alba* in der Volksmedizin (16,45, 146,247).

Die erfahrungsheilkundlichen Indikationen beider Pflanzen sind nahezu identisch. *Wedelia calendulacea* wird wie *Eclipta alba* bei Krankheiten der Leber und Gallenblase, kurativ bei Gelbsucht und als Tonikum, Stomachikum, Cholagogum und Blutreinigungsmittel verwendet (16,31,45,145,147,150).

In der Indischen Medizin wird der Preßsaft aus frischen Blättern von *Wedelia calendulacea* gegen Fieber und Gelbsucht verabreicht (16).

Bei der einzigen bisher durchgeführten pharmakologischen Untersuchung wurde für einen wäßrig-alkoholischen Extrakt der ganzen Pflanze eine Wirkung auf das ZNS festgestellt (Anti-Amphetamin-Wirkung). Die LD₅₀ des Extrakts lag bei 500 mg/kg (203).

Über die Inhaltsstoffe von *Wedelia calendulacea* ist wenig bekannt. Außer β -Amyrin und Stigmasterol (150,163) wurde von der Arbeitsgruppe von GOVINDACHARI aus den frischen Blättern der Pflanze Wedelolacton isoliert und strukturell aufgeklärt (31, 204,205). Dieselbe Arbeitsgruppe synthetisierte 1957 zum ersten Mal das unsubstituierte Coumestan sowie Wedelolactontrimethylether (184,206).

Später wurden zur Synthese der natürlich vorkommenden Coumestane und verschiedener Derivate drei weitere Synthesewege beschrieben (166,207).

2. Untersuchung von EtOAc-Fractionen

Aus dem Methanolextrakt der Droge stellten wir drei verschiedene EtOAc-Fractionen (EtOAc W1 - W3) her (Abb. 38, s. Exp. Teil IV. 3.1.).

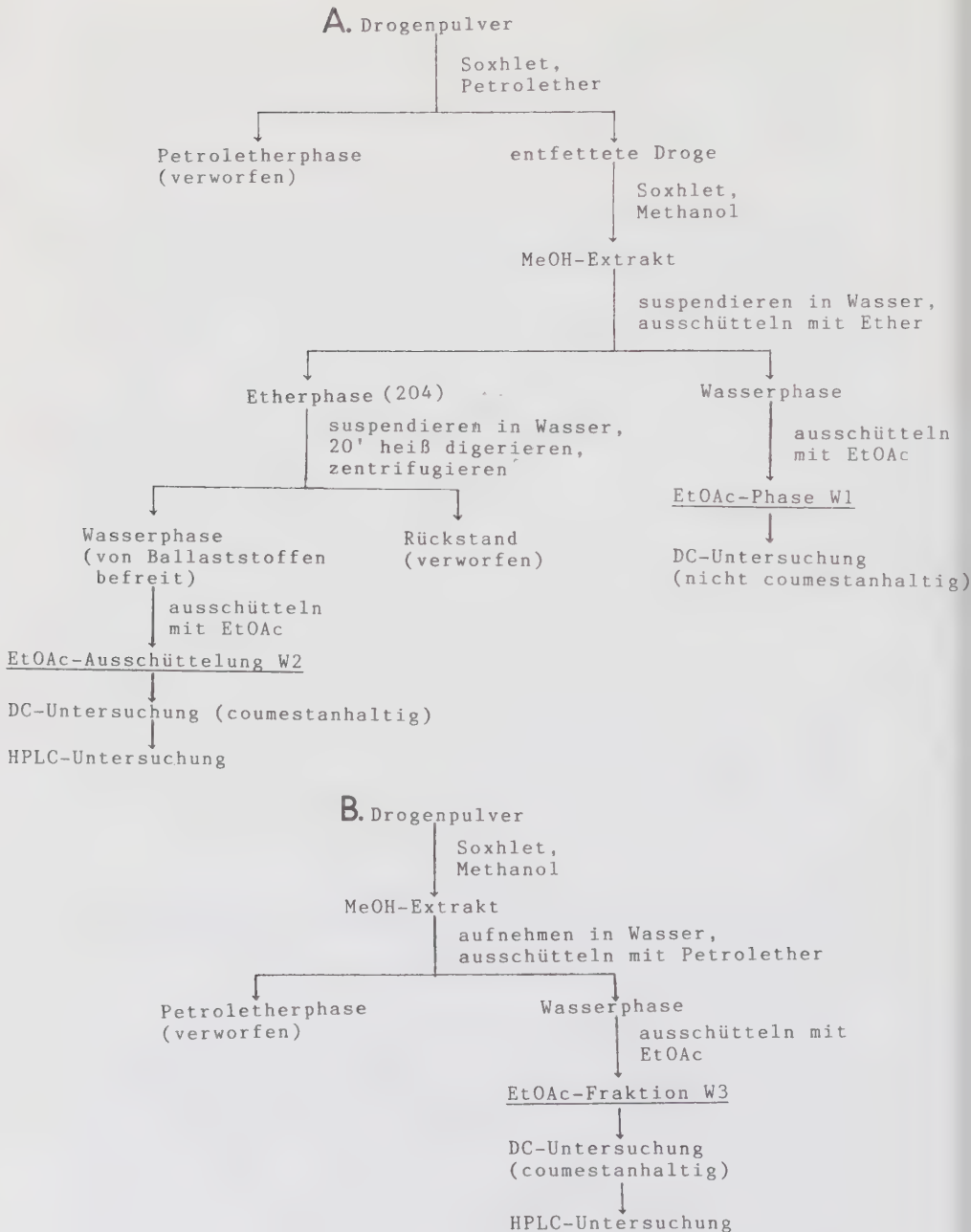


Abb. 38: Herstellung von EtOAc-Fractionen aus *Wedelia calendulacea* (s. Exp. Teil IV. 3.1.)

DC-Untersuchungen der EtOAc-Fractionen in LM I und II lieferten Hinweise auf das Vorliegen von Wedelolacton und Desmethylnedelolacton in W2 und W3. Die Konzentration der Coumestane war allerdings sehr gering.

Im Hepatozyten-Test wurde die Fraktion W2, die eine etwas höhere Coumestan-Konzentration zu enthalten schien, auf ihre antihepatotoxische Wirkung geprüft. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 21: Antihepatotoxische Aktivität der EtOAc-Fraktion W2 aus *Wedelia calendulacea*

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100±3	100±2
EtOAc-Fraktion W2	0,01	107±6	99±2
	0,1	97±6	79±1*
	1,0	52±2*	64±1*

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, wirksam, $p < 0,001$, $n=3$

Die EtOAc-Fraktion war in beiden Testmodellen signifikant, jedoch im Vergleich zu der EtOAc-Fraktion aus *Eclipta alba* wesentlich geringer aktiv (vgl. Tab. 14, S. 68).

Im Kontrollversuch reduzierte die Fraktion die Transaminaseaktivität auf 83% der Kontrollwerte und wirkte damit wenig enzyminhibitorisch (Dosis: 1 mg/ml, GPT-Aktivität 400 U/l (Kontrolle) bzw. 330 U/l (EtOAc W2)).

3. Nachweis der Coumestane

Das Vorhandensein von Wedelolacton und Desmethylwedelolacton wurde durch HPLC-Untersuchungen der Fraktionen W2 und W3 nachgewiesen, da die vorliegenden Mengen an Coumestanen für eine Isolierung nicht auszureichen schienen. Beide Ethylacetat-Frak-tionen wurden in TS IV chromatographiert. Die Fingerprints sind in Abb. 39 wiedergegeben.

Durch Vergleich der Retentionszeiten und Überspritzungsversuche mit Wedelolacton und Desmethylwedelolacton aus *Eclipta alba* in TS I, II und III sowie durch die on-line registrierten UV-Spektren wurde eindeutig bewiesen, daß beide Coumestane auch in *Wedelia calendulacea* vorkommen (s. Abb. 39).

Bestätigt wurde das Vorliegen von Desmethylwedelolacton durch Anreicherung der Verbindung über präparative DC der EtOAc-Fraktion W2 und Acetylierung der so gewonnenen Substanz im Mikro-maßstab (Ausbeute: <1 mg). Das Acetat wurde in LM IV chromato-graphiert (HPTLC-Platten). Es stimmte nach Rf-Wert und Farbreak-tionen (mit NST/PEG kräftig gelbe Fluoreszenz im UV 365 nm) mit Desmethylwedelolactonperacetat (E3-Acetat) aus *Eclipta alba* überein.

Das Vorkommen von Desmethylwedelolacton in *Wedelia calendulacea* ist bisher noch nicht beschrieben worden. *

Bezogen auf den Gehalt an Desmethylwedelolacton in EtOAc 1 aus *Eclipta alba* (3,5%, s. Tab. 18) ermittelten wir durch Vergleich der Peakhöhen unter Berücksichtigung der Einspritzmengen (HPLC, TS II), daß der Gehalt an Wedelolacton in W2 nur etwa 0,4% und an Desmethylwedelolacton etwa 0,75% betragen mußte.

* Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit, in der die Isolierung von Desmethylwedelolacton und "Norwedelosäure" (hier liegt das Benzofuran-Derivat mit freier Carboxylgruppe vor) aus frischen Blättern von *Wedelia calendulacea* beschrieben wird (213).

Damit war der Gehalt dieser Fraktion an Wedelolacton etwa 40 mal geringer als in der EtOAc-Fraktion 1 aus *Eclipta alba*.

Die Retentionszeiten und UV-Spektren der Peaks C, E, F und I in EtOAc W3 ließen vermuten, daß diese Peaks wahrscheinlich von einer "Isochlorogensäure-Fraktion" stammen (s. Abb. 32, S. 86). Aufgrund seines UV-Spektrums sollte auch der Peak K einem Kaffeesäure-Derivat zuzuordnen sein.

Da die EtOAc-Fraktion W2 trotz der geringen Coumestan-Konzentrationen eine relativ starke Wirkung im Hepatozyten-Test zeigte, ist wahrscheinlich, daß andere Verbindungen wie z.B. die Kaffeesäureester zur antihepatotoxischen Gesamtwirkung der Fraktion beitragen.

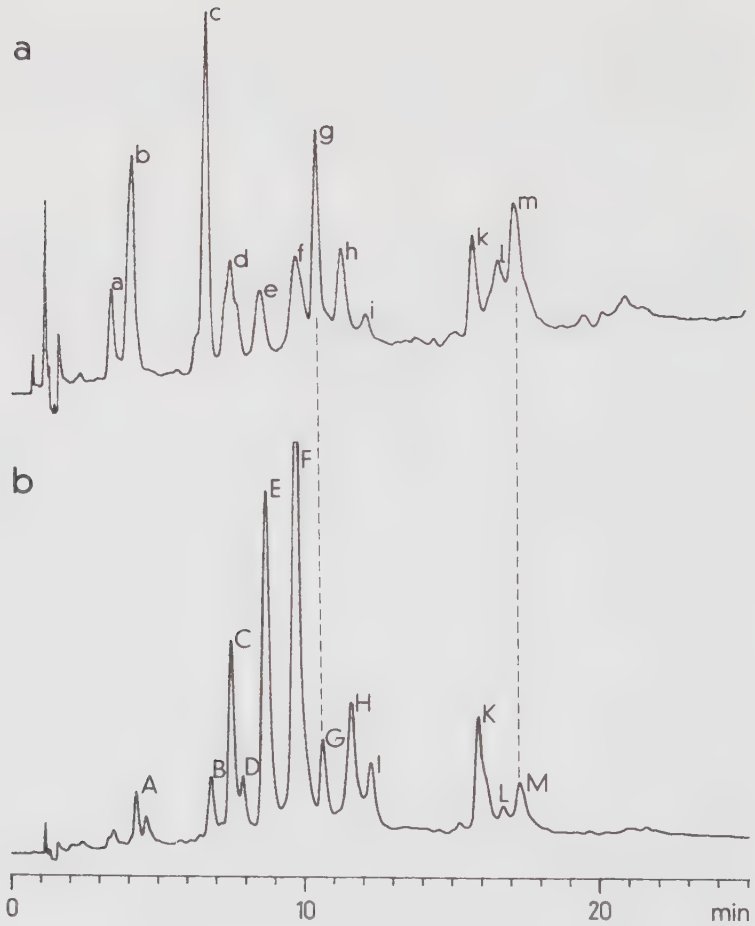


Abb. 39: HPLC-Fingerprints der EtOAc-Fractionen W2 (a, oben) und W3 (b, unten) aus *Wedelia calendulacea* (TS IV, Detektion: 351 nm)

Wedelolacton: Peak m (EtOAc W2) bzw. M (EtOAc W3)

Desmethywedelolacton: Peak g (EtOAc W2) bzw. G (EtOAc W3)

KAPITEL 5:

PHYTOCHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON LOPHOPHYTUM LEANDRI EICHL. (FLOR DE PIEDRA)

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Systematik, Verbreitung und botanische Beschreibung

Lophophytum leandri (= Flor de Piedra) aus der Familie Balanophoraceae wurde erstmals von Eichler im Jahre 1869 beschrieben.

Innerhalb der Reihe Balanophorales sind die Balanophoraceae die einzige Familie. Nach ENGLER (106) wird diese Familie in 6 Unterfamilien eingeteilt. *Lophophytum* ist eine der 4 Gattungen der Unterfamilie Lophophytoideae. Neben der Art *Lophophytum leandri* gibt es weitere 3 Arten (*L. mirabile*, *L. Weddellii* und *L. bolivianum*).

Lophophytum leandri kommt wie die anderen Arten der Gattung in tropischen und subtropischen Wäldern Südamerikas vor. Man findet diese Pflanze besonders häufig in Brasilien, Peru, Paraguay, Bolivien und Argentinien.

Lophophytum leandri ist ein chlorophyllfreier Schmarotzer, der auf den Wurzeln tropischer Bäume gedeiht. Der Parasit ist wegen seiner rotbraunen Farbe und seines steinartigen, in der Erde verborgenen Habitus kaum sichtbar. Das mit Schuppen bedeckte, narbige, etwa faustgroße Rhizom sitzt der Nährwurzel des Wirtsbaumes auf.

Knollenartige Auszweigungen des Rhizoms gehen zur Blütezeit in den etwa 30 cm langen, zapfenähnlichen Blütenstand über, der dann als einzig sichtbarer und auffallender Teil von *Lophophytum leandri* aus dem Boden herausragt. Daher kennt man die Pflanze in Südamerika unter dem Namen "Flor de Piedra", = Steinblüte. Der Name der Gattung stammt, abgeleitet von der Form des Blütenstandes, vom griechischen Wort für Haarschopf.

Die Steinblüte hat weder Stamm noch Blätter. Am zwittrigen, dunkel rotbraunen, zylindrischen bis kegelförmigen, geraden

oder gekrümmten Blütenstand sitzen am oberen Teil die kleinen, gelben, kolbenförmigen männlichen Blütenköpfchen. Am unteren Teil befinden sich, teilweise unter aufrechten, scharfen, dreieckigen Schuppen verborgen, die gelben bis rötlichen weiblichen Blüten (Abb. 40).

(34,39,214,215,224)

Das Homöopathische Arzneibuch (195) gibt eine Beschreibung der mikroskopischen Merkmale von *Lophophytum leandri*.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Habituszeichnung von *Lophophytum leandri* sowie Detailzeichnungen der männlichen und weiblichen Blütenköpfchen (aus (225)).

1.2. Volksmedizinische Verwendung

Nach SCHWABE verwenden die Indios Südamerikas *Lophophytum leandri* bei Verdauungsstörungen, insbesondere Lebererkrankungen, Epilepsie und "bösartigen Krankheiten" (34,39,40,216). RAESIDE nennt als weitere volksmedizinische Indikation katarrhalische Gelbsucht (214).

1.3. Flor de Piedra in der Homöopathie

Flor de Piedra ist im HAB (4. Nachtrag 1985) mit einer Monographie enthalten (195). Die Urtinktur und flüssige Verdünnungen werden aus der grob gepulverten Droge (ganze, getrocknete Pflanze) nach Vorschrift 4a hergestellt. Die Urtinktur entspricht der D1. Nach dem HAB besteht die Droge meist aus den oberen Teilen der Blütenstandsachsen.

Von Flor de Piedra liegt eine homöopathische Arzneimittelprüfung vor (34,39,214,216).

Erfolgreich eingesetzt wird Flor de Piedra in der Homöopathie bei Erkrankungen der Schilddrüse und bei verschiedenen Herz- und Koronargefäßerkrankungen. Die homöopathischen Zubereitungen haben jedoch ihre Hauptanwendung bei verschiedenen Hepatopathien, wie z.B. Hepatosen, hepatogener Migräne und akuter Hepatitis, sowie bei Erkrankungen der Gallenwege (34,35,39,40,217).

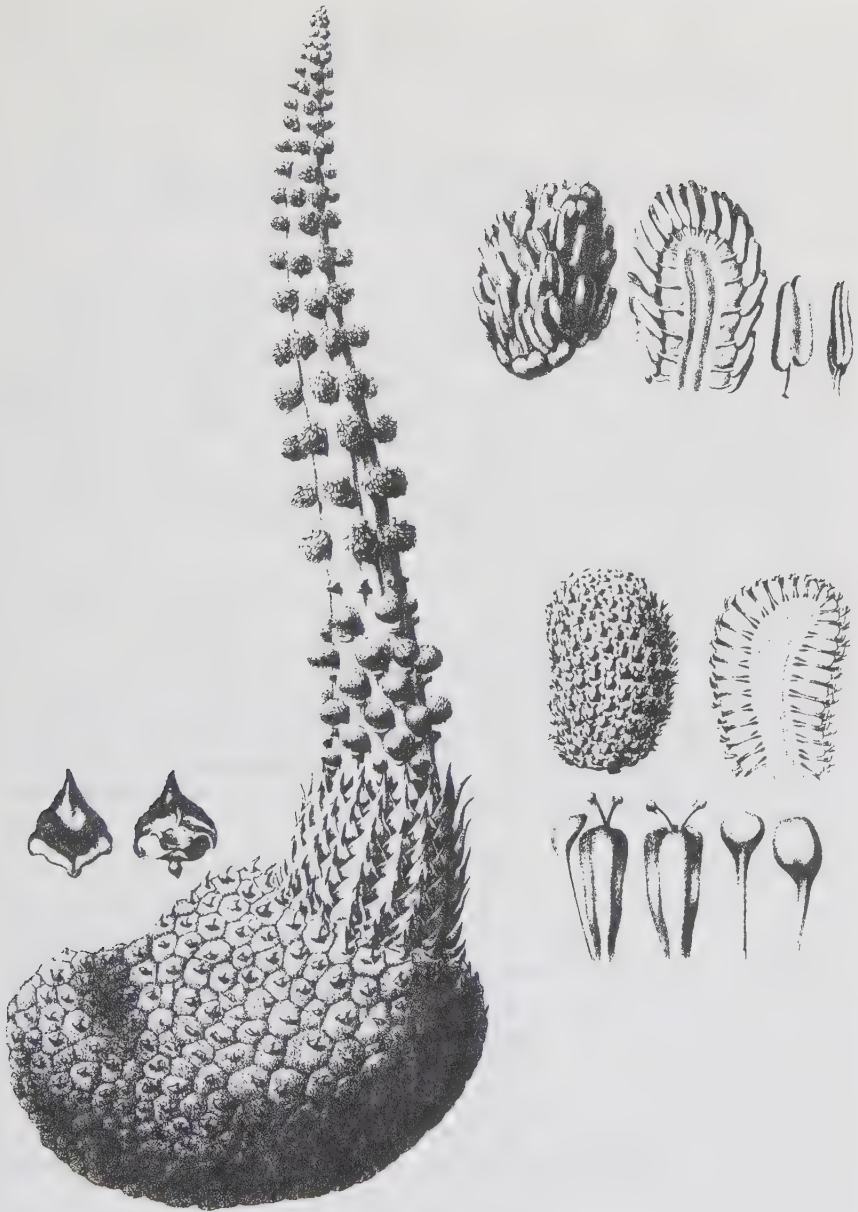


Abb. 40

LOPHOPHYTUM LEANDRI EICHL.

Habituszeichnung und Detailzeichnungen der Blüten aus (225)

Bei Leberkranken konnten SCHWABE und HERZ (34,39,216) mit Flor de Piedra D4 und D6 eine schnell einsetzende, subjektive Besserung beobachten. Auch FREIWALD (217) beobachtete nach p.o. und i.v. Applikation der D4 bis D6 eine Wirkung bei verschiedenen Erkrankungen der Leber und Gallenwege.

Eindrucksvolle Erfahrungen machten WOLTER (218,219,221) und GREIFF (220) mit Flor de Piedra in der Veterinärmedizin bei Hepathopathien aller Tierarten.

Bei Schweinen, die nach Intoxikation infolge eines Wurmbefalls (Strongyloidosis) unter sekundären, schwersten, oft lebensbedrohlichen Leberschäden litten (toxische Leberdegeneration), konnte nach einmaliger s.c. Injektion von Flor de Piedra D3 bereits nach wenigen Tagen histologisch eine regenerierende Wirkung auf das Lebergewebe nachgewiesen werden. Nach wenigen Wochen kam es zur vollständigen histologischen Leberregeneration und Heilung der vorher "kümmernden" Tiere.

Auch bei Ferkeln mit Fettleber und Leberzellnekrose konnte nach einmaliger Gabe von Flor de Piedra D3 eine gute Fortentwicklung der Tiere sowie vollständige histologische Leberregeneration nachgewiesen werden (216,218-220).

Bei Hunden wurden Erfolge bei hepatogen bedingten Krankheiten erzielt (220).

In der Rinderpraxis konnte nach einmaliger Injektion von Flor de Piedra D3 bei Azetonämie, einer schwer zu beeinflussenden Stoffwechselerkrankung, bei der die Leberschädigung im Vordergrund steht, eine signifikante Wirkung von Flor de Piedra gegen Lebererkrankungen bestätigt werden. Die klinisch beobachtete Besserung konnte durch korrespondierende serologische Untersuchungen objektiviert werden (Bestimmung von GOT, alkalischer Phosphatase und Bilirubin). Auch bei Hepatosen und Hepatodystrophien von Rindern zeigte Flor de Piedra in homöopathischen Potenzen günstige Effekte (220,221).

Nach neueren Untersuchungen von HARISCH und Mitarb. (222) war nach vorausgegangener (24 h) Verabreichung von Flor de Piedra D4 (0,5 ml i.p.) die CCl_4 -induzierte Fetteinlagerung in die Rattenleber deutlich geringer als bei der Kontrollgruppe (histochemische Befunde). Die Potenz beeinflusste auch die durch CCl_4 veränderten Glutathion-Konzentrationen in der Rattenleber signifikant.

Die Anwendung von Flor de Piedra als "reines Homöopathikum" sollte nach WOLTER (219) nur mit genauer Kenntnis des Arzneimittelbildes erfolgen.

Die Potenz D3 wird zur Behandlung akuter Leberschäden und die D4 zur Dauertherapie verwendet.

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Es liegen verschiedene Berichte mit teilweise recht unklaren Angaben über das Vorkommen der Elemente Eisen, Jod und Brom (wahrscheinlich in organischer Bindung), Glucose, Schleim, Albumin, Säuren, wachsartigen und adstringierenden Stoffen sowie Bitterstoffen vor (35,39,214,216).

Von KLOSS und Mitarb. (215,223) wurden polymere Procyanidine, und die Gerbstoffbausteine (-)-Epicatechin und (-)-Epicatechin-(5- oder 7-)-glucosid nachgewiesen. Außerdem wurden von diesem Arbeitskreis die folgenden Flavonoide isoliert und strukturell aufgeklärt: die Agyka Naringenin, Eriodictyol und Taxifolin sowie die Glykoside Naringenin-7-glucosid, Eriodictyol-7-glucosid und Quercetin-7-glucosid. Papierchromatographisch wurde auch Quercetin nachgewiesen (223).

Weitere phytochemische Untersuchungen dieser Droge lagen zum Beginn dieser Arbeit nicht vor.

Außer einer Literaturangabe über die Senkung von Cholesterin und Lipoproteinen durch "ein Wirkstoffkonzentrat mit den sieben für die Droge charakteristischen Flavonoiden" (40) la-
gen, abgesehen von den homöopathischen Arzneimittelprüfungen, keine pharmakologischen Untersuchungen von Lophophytum lean-
dri vor.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Lokalisierung des Wirkprinzips

Durch Soxhlet-Extraktion des Drogenpulvers erhielten wir in etwa 9%iger Ausbeute einen braunen MeOH-Gesamtextrakt, der zur Anreicherung der Flavonoide in Wasser aufgenommen und erschöpfend mit Ethylacetat ausgeschüttelt wurde.

Gesamtextrakt und EtOAc-Ausschüttelung wurden im Hepatozyten-Test geprüft.

Tabelle 22: Wirkung von Extrakten aus *Lophophytum leandri* auf CCl_4 - und GalN-geschädigte Hepatozyten

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100±1	100±2
MeOH-Extrakt	1,0	62±3*	77±0*
Aceton-Extrakt (6)	1,0	92±0	76±3*
EtOAc-Fraktion	1,0	52±4*	54±3*

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, $p < 0,001^*$, $n=3$.

Der Vergleich mit einem früher hergestellten Aceton-Gesamtextrakt zeigte, daß durch Methanolextraktion offensichtlich die Wirkprinzipien vollständiger erfaßt wurden, da der MeOH-Extrakt im CCl_4 -Modell wesentlich stärker wirkte als der Aceton-Extrakt.

Jedoch erwies sich die EtOAc-Fraktion in beiden Testsystemen als deutlich wirksamer als die beiden Extrakte, so daß die Wirkprinzipien hier zu suchen waren.

Es war naheliegend, auch hier die Flavonoide (s. 1.4.) für die Wirkung verantwortlich zu machen, da für zahlreiche Flavonoide eine z.T. starke Wirkung in diesen beiden Testmodellen

nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. 3 und (20,53,55,83,142)).

2.2. DC-Untersuchungen

Die EtOAc-Fraktion trennte sich im Laufmittel nach BITTNER (227) (LM I) in mindestens sieben flavonoide Verbindungen auf. Dieses Laufmittel war besonders zur Trennung der drei Flavonoidglykoside (mittlerer Rf-Bereich) geeignet. Zur Trennung der Flavonoidaglyka eignete sich wie bei der Trennung der Coumestane von *Eclipta alba* das System Toluol-Aceton-Ameisensäure (11:6:1) (LM II).

Co-Chromatographie mit Hilfe von Testsubstanzen erlaubte die Zuordnung der in *Lophophytum leandri* beschriebenen Flavonoide. Im Einzelnen konnten die Verbindungen Naringenin, Eriodictyol, Taxifolin, Naringenin-7-glucosid und Eriodictyol-7-glucosid nachgewiesen werden (LM I-V, s. Abb. 41).

Im Chromatogramm fiel außerdem eine stark ausgeprägte Zone bei Rf 0,7 (LM I) bzw. 0,5 (LM II) auf (Zone 4 in Abb. 41), die sich keiner der bisher bekannten Verbindungen zuordnen ließ. Diese phenolische Substanz, die sich mit FeCl₃- und NST/PEG-Reagens detektieren ließ, erhielt die Bezeichnung Substanz "P".

Eine Aufstellung der Rf-Werte der Flavonoide und der Substanz P in LM I - V befindet sich im Exp. Teil (Tabelle 27, S. 164).

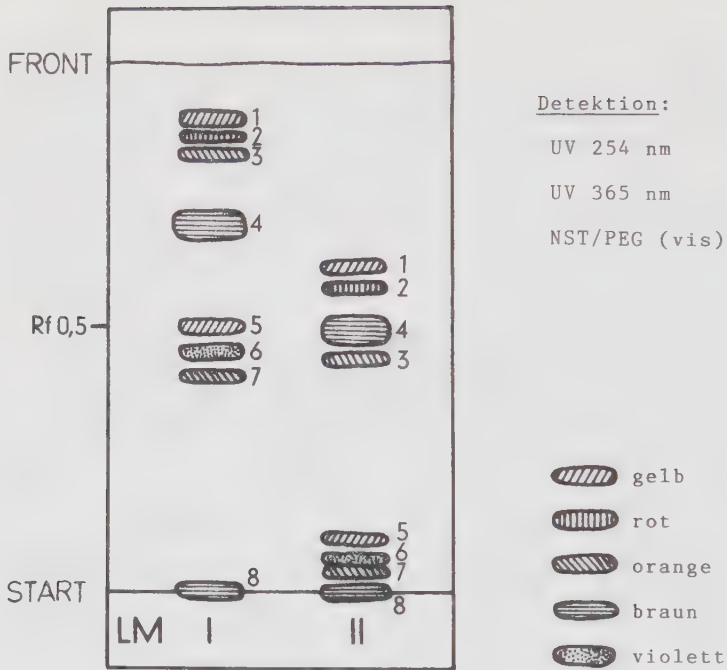
Quercetin (223), Catechin und Epicatechin (215) konnten nicht nachgewiesen werden.

Ein nach (125) durchgeführtes DC-Screening auf Anthrachinone, Alkaloide, Cumarine, Saponine und etherische Öle verlief ebenfalls negativ.

2.3. Isolierung von Substanz P

Zur säulenchromatographischen Anreicherung wählten wir LM I. Wir erhielten aus 3 g EtOAc-Fraktion 1 g einer stark angereicherten Fraktion. Wegen des starken Tailings war jedoch die Trennung von P und den Flavonoidglykosiden (Zone 5-7, Abb. 41) nicht vollständig gelungen.

Zur Reindarstellung von Substanz P wurde die präparative DC auf Kieselgel-Fertigplatten gewählt. Nach Entwicklung der



Zuordnung:

- 1 = Naringenin
- 2 = Eriodictyol
- 3 = Taxifolin
- 4 = unbekannt, Substanz P
- 5 = Naringenin-7-glucosid
- 6 = Eriodictyol-7-glucosid
- 7 = unbekannt, nicht untersucht
(Quercetinglykosid?)
- 8 = Gerbstoffe (Procyanidine)

Abb. 41: DC der EtOAc-Fraktion aus *Lophophytum leandri*

vorentwickelten Platten in LM II erhielten wir in 15%iger Ausbeute eine hellbraune, pulvrige, DC-reine Substanz.

2.4. Identifizierung von Substanz P

Da Gerbstoffe und Gerbstoffbausteine allgemein in der Familie der Balanophoraceae vorkommen (224) und ein UV-Spektrum mit Maxima bei 258 und 295 nm sowie das IR-Spektrum auf das Vorliegen einer einfachen Phenolcarbonsäure schließen ließ (190), prüften wir mit Hilfe von Vergleichssubstanzen dünnschichtchromatographisch auf solche Verbindungen. Durch Co-Chromatographie in LM II, IV, VI und VII konnte Substanz P als Protocatechusäure identifiziert werden.

Bestätigt wurde das Ergebnis durch ein IR-Überlagerungsspektrum sowie durch den Schmelzpunkt der aus Methanol kristallisierten weißen Nadeln und den Mischschmelzpunkt mit authentischer Protocatechusäure.

Protocatechusäure (Abb. 42), deren Konzentration in der EtOAc-Fraktion relativ hoch war, ist eine häufig vorkommende Pflanzensäure. Als Inhaltsstoff von *Lophophytum leandri* ist sie bisher noch nicht beschrieben worden.

Somit sind alle Zonen im Chromatogramm der antihepatotoxisch wirksamen EtOAc-Fraktion aus *Flor de Piedra* identifiziert. Weitere Verbindungen wurden nicht aufgefunden.

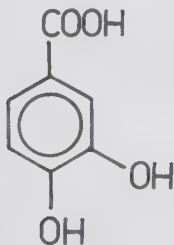


Abb. 42: Struktur von Protocatechusäure

2.5. Analytische HPLC

Die HPLC-Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion erfolgte auf einer LiChrospher RP18-Säule mit dem linearen Gradienten 10 bis 40% Acetonitril unter Phosphorsäurezusatz (s. Exp. Teil IV. 4.5.).

Durch Überspritzen mit authentischen Flavonoiden und Protocatechusäure sowie durch die on-line aufgenommenen UV-Spektren konnten alle Hauptpeaks zugeordnet werden (Abb. 43).

Aufgrund des UV-Spektrums könnte es sich bei dem mit "x" bezeichneten kleinen Peak auch um ein Flavanoglykosid handeln. Ein Peak mit dem UV-Spektrum von Quercetin (223) oder eines Quercetinglykosids (215) wurde nicht gefunden.

2.6. Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der Flavonoide und Protocatechusäure wurde, ähnlich wie schon bei *Butea monosperma* und *Eclipta alba* (s. Kap. 3 und 4A), nach der Methode des externen Standards durchgeführt. Die Eichgeraden wurden durch Einspritzen unterschiedlicher Mengen einer 0,02%igen Lösung von Protocatechusäure, Naringenin, Eriodictyol, Taxifolin und Eriodictyol-7-glucosid erstellt. Sie sind im Exp. Teil abgebildet (Abb. 47, IV. 4.5.). Mit Hilfe der Eichgeraden von Eriodictyol-7-glucosid konnte auch der Gehalt an Naringenin-7-glucosid errechnet werden (Korrekturfaktor für die integrierte Fläche: 0,96444 (MG N-7-glc : MG E-7-glc)).

Zwischen 0,1 und 0,4 µg bestand bei allen Substanzen ein lineares Verhältnis zwischen der Peakfläche und der eingespritzten Menge. Für jede Eichgerade wurden analog den früheren Gehaltsbestimmungen die Faktoren A (Steigung) und B durch lineare Regression errechnet ($x(\text{Menge}) = -B + A \cdot y(\text{Fläche})$) (s. Tab. 23).

Als Detektionswellenlänge wählten wir 290 nm. Nach Einspritzen unterschiedlicher Mengen einer 0,1%igen Lösung des MeOH-Gesamtextraktes und einer 0,06%igen Lösung der EtOAc-Fraktion erhielten wir die in der folgenden Tabelle angegebenen Gehalte.

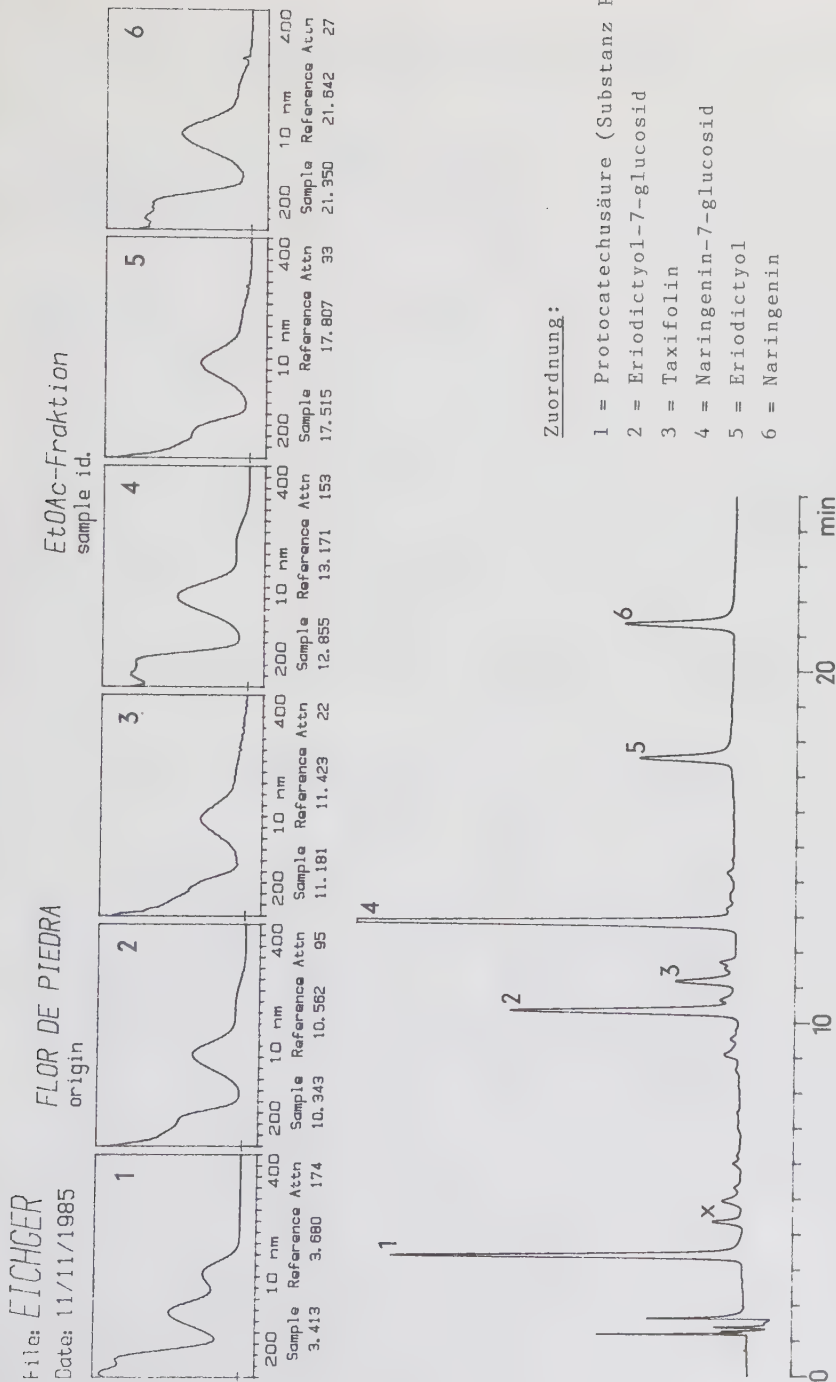


Abb. 43: HPLC-Fingerprint der EtOAc-Fraktion aus Lophophytum leandri und UV-Spektren der Hauptpeaks (Detektion: 290 nm, Trennsystem s. Exp. Teil IV. 4.5.)

Tabelle 23: Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der in *Lophophytum leandri* enthaltenen Verbindungen

Substanz	A	B	s**	r**	% MeOH- Extr.*	% EtOAc- Frak.*
Protocatechusäure	0,250	0,001	0,0017	0,9999	1,13	6,19
Eriodictyol-7-glucosid	0,221	0,007	0,0037	0,9996	1,24	4,65
Naringenin-7-glucosid	-	-	-	-	1,95	9,55
Taxifolin	0,140	0,000	0,0019	0,9999	0,18	0,96
Eriodictyol	0,125	0,005	0,0024	0,9998	0,18	1,24
Naringenin	0,127	0,004	0,0041	0,9995	0,22	1,51

* Mittelwerte aus je drei Bestimmungen

** s = Standardabweichung, r = Korrelationskoeffizient der Eichgeraden (s. S. 118 und Anhang)

Naringenin-7-glucosid war die Hauptverbindung des MeOH-Extraktes und der EtOAc-Fraktion aus *Lophophytum leandri* (Peak 4 in Abb. 43).

Der Gehalt an Flavonoidglykosiden war wesentlich höher als an Flavonoidaglyka.

Ungewöhnlich hoch war der Gehalt an Protocatechusäure mit etwa 1% des Extraktes bzw. 6% der Fraktion. Nach HERRMANN (190) ist der Gehalt an Hydroxybenzoesäuren in Pflanzen meist gering. Nur selten sollen, wie hier, Konzentrationen im Prozentbereich auftreten.

3. Pharmakologische Untersuchungen der in Lophophytum leandri vorkommenden Verbindungen

Wir testeten die Hauptinhaltsstoffe der EtOAc-Fraktion, drei Flavonoidaglyka, zwei Flavonoidglykoside und Protocatechusäure, auf ihre antihepatotoxischen Wirkungen im Hepatozyten-Test:

Tabelle 24: Wirkung von Substanzen aus Lophophytum leandri im Hepatozyten-Test

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)		Direkter Ein- fluß auf GPT (%), Dosis: 1 mg/ml
		CCl ₄	GalN	
Kontrolle	-	100	100	100
Naringenin	0,01	96±6	90±3	83
	0,1	121±6 ⁺	51±3*	
	1,0	79±2	322±11 ⁺	
Eriodictyol	0,01	107 ^b	90±2	85
	0,1	122 ^{b+}	90±1	
	1,0	110 ^b	19±0**	
Taxifolin	0,01	104±4	99±3	85
	0,1	124±4 ⁺	70±7	
	1,0	145±3 ⁺	61±3*	
Naringenin-7-glc	1,0	6 ^a	-	-
Eriodictyol-7-glc	0,01	99±1	85±3	-
	0,1	96±3	70±2**	
	1,0	39±1**	118±3 ⁺	
Protocatechusäure	0,01	101 ^b	87±5	92
	0,1	101 ^b	78±3*	
	1,0	98 ^b	73±1**	

Signifikanter Unterschied zur Kontrolle, p<0,01* oder p<0,001**, n=3 bzw. n=2^a

⁺ toxisch

^b Mittelwert aus 2 Testreihen (je n=3)

Aus Tabelle 24 läßt sich entnehmen, daß der direkte Einfluß der Flavonoidaglyka und Protocatechusäure auf die Aktivität von GPT vernachlässigt werden kann.

Von den Flavonoidaglyka war nur Naringenin im CCl_4 -Testmodell wirksam (bei 1 mg/ml). Die anderen beiden Verbindungen wirkten leicht toxisch auf die CCl_4 -geschädigten Hepatozyten (Werte über 100% GPT).

Umgekehrt wirkte Naringenin in einer Dosis von 1 mg/ml im GalN-Modell sehr stark toxisch, Eriodictyol und Taxifolin waren dagegen stark wirksam. Eriodictyol gehört zu den in diesem Testsystem auffallend aktiven Verbindungen mit einer zu Wedelolacton identischen Aktivität (s. Tab. 19 und S. 93-95).

Die beiden Flavonoidglykoside waren im CCl_4 -Testmodell in einer Dosis von 1 mg/ml stark aktiv. Dagegen wirkte Eriodictyol-7-glucosid im GalN-Testmodell in dieser Konzentration toxisch, zeigte jedoch bei 0,1 mg/ml noch gute Wirkungen.

Damit scheint die ortho-Dihydroxygruppe am Ring B bei Flavanonen für die Wirkung gegen GalN-induzierte Schäden an Hepatozyten eine wichtige Rolle zu spielen. Eine zusätzliche OH-Gruppe am C3 (Taxifolin) verringert jedoch die Wirkung wieder. Ähnlich wie Taxifolin wirken (+)-Catechin und (-)-Epicatechin im GalN-Modell (197), so daß die Carbonylgruppe wenig Einfluß auf die Wirkung in diesem Test zu haben scheint. Toxisch wirken offenbar Flavanone, die nur eine OH-Gruppe am Ring B haben.

Die Glucosidierung am C7 hat eine starke Steigerung der Wirkung von Flavanonen im CCl_4 -Modell zur Folge. Das Flavanondiglucosid Butrin zeigte in diesem Test aber keine Wirkung (s. Tab. 10). Im GalN-Modell war eine Aufhebung der Wirkung zu beobachten: Eriodictyol-7-glucosid wirkte im Gegensatz zum stark aktiven Aglykon toxisch.

Dagegen ist bei Flavonen mit einer o-Dihydroxygruppe im Ring B die Wirkung in beiden Testmodellen auffallend (z.B. Eupafolin: 18 bzw. 20% GPT bei 1 mg/ml (83)). Ist bei sonst gleicher Struktur nur eine OH-Gruppe vorhanden wie bei Hispidulin, so verringert sich die Wirkung in beiden Testmodellen deutlich,

es tritt jedoch keine toxische Wirkung auf.

Umgekehrt wie bei den Flavanonen verringert sich durch eine Glykosidierung am C7 oder auch am C3 (Flavanonole) die Wirkung gegen CCl_4 -induzierte Zytotoxizität. Die Wirkung gegen GalN-induzierte Schädigungen wird dagegen erhöht (20,83).

Zur Erstellung weiterer Struktur-Wirkungsbeziehungen ist die Testung weiterer Flavonoide notwendig.

Protocatechusäure war im CCl_4 -Modell unwirksam. Gegen GalN-induzierte Hepatotoxizität war diese Hydroxybenzoesäure dagegen signifikant aktiv, wenn auch nicht in auffallender Weise. Die zusätzliche Hydroxygruppe der Gallussäure steigert die Wirkung in beiden Testmodellen auf etwa 30% GPT-Aktivität (bei 1 mg/ml, (197)). Auch Kaffeesäure ist im Vergleich zu Protocatechusäure in beiden Testmodellen wesentlich wirksamer. Dagegen wirken Zimtsäurederivate ohne o-Dihydroxygruppe im CCl_4 -Modell nicht und gegen GalN-induzierte Schädigungen im Bereich 70-90% und damit ähnlich wie Protocatechusäure (28).

Addierte man die einzelnen Wirkungen der sechs Verbindungen (für 1 mg/ml) bezogen auf ihren Anteil an der EtOAc-Fraktion (insgesamt 24,1%, s. Tabelle 23), so ergibt sich eine gute Korrelation zur antihepatotoxischen Wirkung der Fraktion (s. Tabelle 22). Damit ist die Wirkung der EtOAc-Fraktion in diesem Test offenbar nur auf die enthaltenen Flavonoide und die Protocatechusäure zurückzuführen. Eine Beteiligung anderer Verbindungen, wie z.B. der Procyanidine, an der antihepatotoxischen Wirkung von *Lophophytum leandri* ist wenig wahrscheinlich.

Für Protocatechusäure wurde von KREUTZKAMP (239) eine hohe Phagozytosesteigerung in Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-4} % nachgewiesen, so daß die immunologische Wirkung von *Lophophytum leandri* auch von Interesse sein könnte.

KAPITEL 6:

UNTERSUCHUNGEN VON EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Systematik, Verbreitung und botanische Beschreibung

Eichhornia crassipes (Mart.) Solms (Synonyme: *Eichhornia speciosa* Kunth. und *Pontederia crassipes* Mart.) gehört zur Familie Pontederiaceae, die 7 Gattungen mit etwa 30 Arten umfaßt. Die Gattung *Eichhornia* ist die einzige Gattung der Unterfamilie Eichhornieae, zu der 6 Arten gehören.

Beheimatet ist *Eichhornia crassipes* im tropischen Südamerika. Die Pflanze wurde jedoch in andere tropische Gebiete verschleppt, so daß sie heute in den tropischen Ländern der ganzen Welt verbreitet ist (vgl. 1.2.).

Eichhornia crassipes ist eine einjährige, schwimmende Wasserpflanze mit luftreichen, angeschwollenen, schwammigen, als Schwimmblasen ausgebildeten Blattstielen. Gelegentlich kann sie auch im Schlamm flacher Gewässer wurzeln. Die Blätter sind herz- oder einierenförmig, messen 50-200 mm im Durchmesser und sind in Rosetten angeordnet. Die Blütenstände sind 150-250 mm lang und mit 3 bis 35 weißen, blauen oder violetten, etwa 25-38 mm langen, trichterförmigen, regelmäßig sechszipfligen, ganzrandigen Blüten besetzt. Wegen dieser schönen, hyazinthförmigen Blütenstände wird *Eichhornia crassipes* auch als Wasserhyazinthe bezeichnet. Die Pflanze blüht das ganze Jahr.

Der dreifächrige Fruchtknoten ist von sechs Staubblättern umgeben. Die Frucht ist eine Kapsel mit zahlreichen, länglichen, fein gerippten Samen, die mehrere Jahre lebensfähig bleiben.

Die Vermehrung erfolgt vor allem vegetativ durch fadenförmige Ausläufer, die am Ende neue Rosetten bilden, und nur in geringem Ausmaß durch die Samen. *Eichhornia crassipes* vermehrt sich außerordentlich schnell: aus 10 Wasserhyazinthen werden in einer einzigen Vegetationsperiode 600 000 Pflanzen, die eine dichte, zusammenhängende, schwimmende Matte bilden, die tropische Flüsse und Seen bedeckt.

(34,40,106,146,228,232,243).



Abb. 44

EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS

oben: Habituszeichnung (bei DIN A4 1/3 der Originalgröße) und
Detailzeichnung des Fruchtknotens (aus (228))

unten: Die Wasserhyazinthe als Zierpflanze auf den Malediven

1.2. Bekämpfung von Eichhornia crassipes

Eichhornia crassipes hat sich nach der Einführung als Zierpflanze in den meisten tropischen Ländern der Welt explosionsartig vermehrt, so daß sie heute in der Dritten Welt eine ernste, gefürchtete Plage ist. Man bezeichnet die Pflanze auch als tropische Wasserpest oder Teufelskraut (36,37,230).

Es gibt große Bemühungen zur Bekämpfung von Eichhornia crassipes, da ihre Ausbreitung ernstliche Probleme verursacht, wie z.B. Überflutungen von Feldern durch behinderte Drainage, Behinderung der Schifffahrt, Fischsterben (die Fische ersticken unter der verfilzten Pflanzenmasse) und Gesundheitsgefährdung der Menschen durch von abgestorbenen Pflanzenteilen verseuchtes Trinkwasser und dadurch, daß der Pflanzenteppich eine Brutstätte für Insekten bildet (Malaria) (146,229,235).

Trotz sogar gesetzlich geregelter Programme zur Bekämpfung von Eichhornia crassipes waren alle Bemühungen zur Kontrolle ihrer Ausbreitung bisher nur wenig erfolgreich (36,235). Man versuchte daher, die Pflanze nutzbar zu machen. Sie wird mit Erfolg als Dünger (Asche und Kompost) eingesetzt sowie eingeschränkt auch als Futterpflanze für Vieh, als Rohmaterial für die Papierindustrie und als pflanzliche Proteinquelle verwendet (36,229,232,235).

Übersichten über diese Maßnahmen sind z.B. bei SHARMA (230) und in (146) zu finden.

1.3. Verwendung in der Volksmedizin und Homöopathie

Über die volksmedizinische Verwendung von Eichhornia crassipes liegt nur ein Bericht von SCHWABE vor, nach dem die Eingeborenen Südamerikas die Pflanze bei Blähsucht, Appetitlosigkeit und anderen Verdauungsstörungen einsetzen (34,36,37,40).

Mehr ist über die Anwendung in der Homöopathie bekannt. Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten mit der Urtinktur bewiesen eine spezifische Wirkung auf die exkretorische Funktion der Pankreas, wobei es zu einem Anstieg der Exkretionsleistung kommt. Eichhornia crassipes wirkt sekretin- und pankreatinähnlich.

Die Indikationen sind insuffiziente Pankreasleistung verschiedener Genese, Maldigestion, chronische Pankreatitis, Postcholestektomie-Syndrom sowie Magen-Darm-Störungen nach einer Hepatitis.

Die besten Erfahrungen machte SCHOELER bei der Anwendung der Potenz D2. Es liegt jedoch keine homöopathische Arzneimittelprüfung vor (34-37,40).

Eichhornia crassipes ist mit einer Monographie im Homöopathischen Arzneibuch (3. Nachtrag 1985) (226) enthalten. Die Ur-tinktur und die flüssigen Verdünnungen werden aus der ganzen, frischen, blühenden Pflanze nach der Vorschrift 3a des HAB durch Mazeration hergestellt.

Es existieren keine pharmakologischen Untersuchungen von *Eichhornia crassipes*. In der Literatur gibt es lediglich eine Angabe über eine LD₅₀ von 750 mg/kg (i.p. bei Mäusen), die für einen wässrig-alkoholischen Extrakt der ganzen Pflanze ohne die Wurzeln gefunden wurde (121).

1.4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Die Wasserhyazinthe ist reich an Mineralien, besonders Kalium, Calcium und Phosphor, und Protein (nach (230) enthält die getrocknete Pflanze 15% Protein) (146,232).

Neben Campesterol und β -Sitosterol wurde ein hoher Gehalt an Stigmasterol (0,07% des Trockengewichtes) nachgewiesen, so daß *Eichhornia crassipes* als potentielle Stigmasterol-Quelle angesehen wird. Bei einer industriellen Verwendung verursacht der 95,5%ige Wassergehalt der Frischpflanze jedoch Probleme z.B. bei der Trocknung und dem Transport (146,233).

Auch über das Vorkommen von Polysacchariden wird berichtet (234, 235).

Aus den Blüten wurde Delphinidin-3-diglucosid isoliert (236).

Nach Literaturangaben fehlen Alkaloide, Saponine, Tannine und Schleime in *Eichhornia crassipes* (231,232).

Weitere Angaben über die Inhaltsstoffe dieser phytochemisch wenig bearbeiteten Droge liegen nicht vor.

2. Bestimmung von Pflanzensäuren

Für die eigenen phytochemischen Untersuchungen stand uns zunächst ein ethanolischer Frischpflanzenansatz zur Verfügung.

Bei einem DC-Screening eines alkoholischen Extraktes (s. Exp. Teil IV. 5.1.) ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen von Saponinen, Bitterstoffen oder Alkaloiden.

Eine EtOAc-Fraktion bildete in LM I bei Rf 0,57 eine Hauptzone aus, die im UV und mit FeCl_3 - und NST/PEG-Reagens detektiert werden konnte. Nach Anreicherung über eine mit RP18-Material gefüllte Säule wurde diese Substanz durch präparative DC, Acetylierung und erneute präparative DC in Form ihres Peracetats isoliert.

Durch das Massen- und ^1H -NMR-Spektrum konnte die Substanz eindeutig als Kaffeesäureethylesterdiacetat identifiziert werden. Die entsprechenden Daten befinden sich im Exp. Teil IV. 5.1.

Da diese Verbindung bei späteren Untersuchungen der getrockneten Droge nicht nachgewiesen werden konnte (LM III), sollte es sich um ein Kunstprodukt handeln, das durch Veresterung der genuin vorliegenden Kaffeesäure mit Ethanol entstanden war (die Frischpflanze wurde 1:1 mit Ethanol angesetzt). Nach HERRMANN (190) liegt die Kaffeesäure selten genuin als Methyl- oder Ethylester vor.

Für weitere Untersuchungen stand uns später die getrocknete Droge zur Verfügung.

Bei der DC-Untersuchung eines Methanolextraktes konnte Stigmasterol (233) nachgewiesen werden (LM II, Rf 0,54). Weitergehende Untersuchungen der lipophilen Inhaltsstoffe von *Eichhornia crassipes* waren im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vorgesehen.

In einer EtOAc-Fraktion waren keine Flavonoide nachweisbar, jedoch ergaben sich Hinweise auf das Vorliegen von Kaffeesäure und weiteren Pflanzensäuren.

GIBBS (231) beschreibt das Vorkommen von Kaffee-, Ferula-, p-Coumar- und Sinapinsäure in der Familie Pontederiaceae.

Bei der DC-Untersuchung der Säuren wurden die Chromatogramme in vier verschiedenen Laufmitteln entwickelt und im UV sowie nach Besprühen mit FeCl_3 - und Naturstoff/PEG-Reagens ausgewertet. Durch Co-Chromatographie mit verschiedenen Vergleichssubstanzen konnte die in Abbildung 45 angegebene Zuordnung getroffen werden.

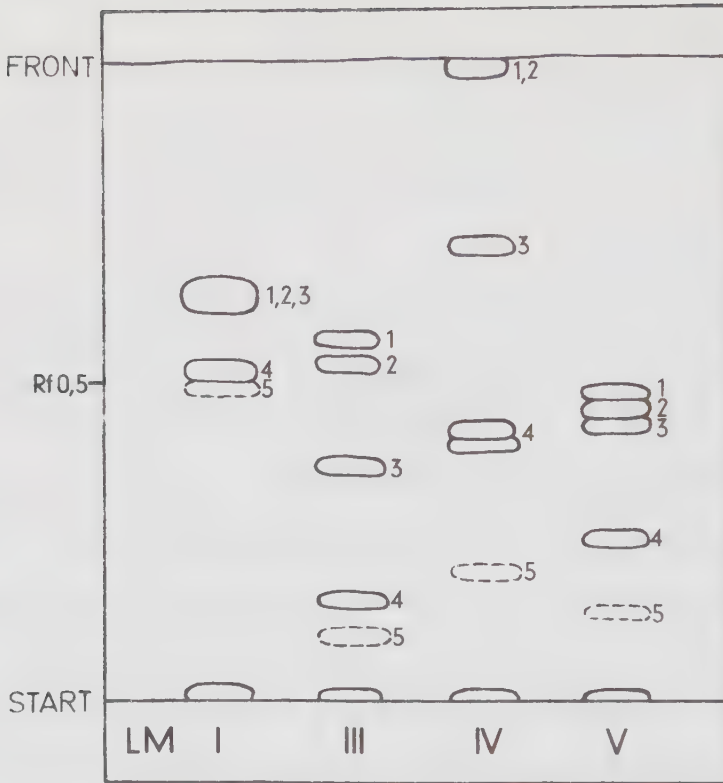
Die endgültige Identifizierung der Säuren erfolgte durch HPLC-Untersuchungen. Nach präparativer DC der Zonen 1 bis 4 (LM III, Abb. 45) aus der EtOAc-Fraktion wurden die isolierten Verbindungen durch Überspritzen mit authentischen Pflanzensäuren zugeordnet (TS I). Wir konnten folgende Säuren identifizieren:

Vanillinsäure (Rt 13,3 min) (DC-Zone 1)
Ferulasäure (Rt 22,4 min) (DC-Zone 2)
4-Hydroxybenzoesäure (Rt 10,6 min) (DC-Zone 3)

Die Verbindung 4 trennte sich in zwei Peaks auf, die als Protocatechusäure (Rt 6,6 min, untere der beiden mit 4 bezeichneten Zonen in LM IV, Abb. 45) und Kaffeesäure (Rt 14,6 min, obere Zone 4 in LM IV) identifiziert werden konnten.

Ein HPLC-Fingerprint der EtOAc-Fraktion zusammen mit den on-line aufgenommenen UV-Spektren der identifizierten Pflanzensäuren ist in Abb. 46 wiedergegeben.

Die Peaks der beiden Hydroxyzimtsäuren (Kaffee- und Ferulasäure) veränderten sich nach einiger Zeit durch Ausbildung von Schultern oder Abnahme der Peakhöhe. Dieses Verhalten ist auf Umlagerungsreaktionen und cis-trans-Isomerie zurückzuführen (190,192). Beispielsweise bildet sich aus der Kaffeesäure bereits beim Aufbewahren in Lösung Esculetin, das wir kurz nach der Isolierung von Zone 4 auf der DC nachweisen konnten (LM III-V, s. Abb. 45). Eine quantitative Bestimmung der Hydroxyzimtsäuren erschien daher wenig sinnvoll.



Detektion:

UV 254 nm

UV 365 nm

FeCl₃

NST/PEG (UV und vis)

Zuordnung:

1 = Vanillinsäure

2 = Ferulasäure

3 = 4-Hydroxybenzoesäure
(p-Coumarsäure)

4 = Kaffeesäure, evtl. weitere Säure
(2 Zonen in LM IV)

5 = Esculetin (nach (190) aus Kaffee-
säure gebildet)

Abb. 45: DC-Skizze der in der EtOAc-Fraktion nachgewiesenen
Phenolcarbonsäuren

Die quantitative Bestimmung der Hydroxybenzoesäurederivate in der EtOAc-Fraktion führten wir wie bei den anderen von uns bearbeiteten Drogen mit Hilfe der HPLC nach der Methode des externen Standards durch. Die apparativen und chromatographischen Daten, die Eichgeraden der drei bestimmten Säuren (Abb. 48) und die einzelnen Ergebnisse der Gehaltsbestimmung (Tabelle 28) sind im Exp. Teil unter IV. 5.2.4. aufgeführt bzw. dargestellt.

Wir erhielten folgende Prozentgehalte (bezogen auf die EtOAc-Fraktion, n=6):

Protocatechusäure: 1,72% ($s_{rel.} = 2,66\%$)

4-Hydroxybenzoesäure: 0,78% ($s_{rel.} = 3,63\%$)

Vanillinsäure: 0,68% ($s_{rel.} = 8,42\%$)

Die Konzentration an Hydroxybenzoesäurederivaten in der EtOAc-Fraktion war mit insgesamt etwa 3,2% sehr gering.

Die im Vergleich zu den früheren Gehaltsbestimmungen höheren relativen Standardabweichungen bei dieser Bestimmung erklären sich durch die niedrigen Gehalte und die stärkere Grundlinienschwankung bei der verwendeten Detektionswellenlänge von 200 nm.

3. Wirkung der Pflanzensäuren im Hepatozyten-Test

Wir testeten 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure im Hepatozyten-Test. Die Ergebnisse für Protocatechusäure sind in Tabelle 24 und für Kaffeesäure, Ferulasäure sowie weitere fünf Zimtsäurederivate in (28) angegeben.

Wie sich der nachfolgenden Tabelle 25 entnehmen läßt, waren die beiden Benzoesäurederivate 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure im CCl_4 -Schädigungsmodell dosisabhängig wirksam. Sie zeigten in der höchsten eingesetzten Dosis eine gute Wirkung. Im Vergleich zu den korrespondierenden Zimtsäurederivaten p-Coumarsäure und Ferulasäure (bei 1 mg/ml 94 bzw. 88% GPT) waren die beiden Benzoesäuren wesentlich wirksamer. Dagegen war Protocatechusäure hier unwirksam (98%), das korrespondierende Zimtsäurederivat Kaffeesäure jedoch stark aktiv (51%). Kaffeesäure war von allen getesteten Zimtsäurederivaten die einzige Verbindung mit nennenswerter Aktivität im CCl_4 -Testmodell (28).

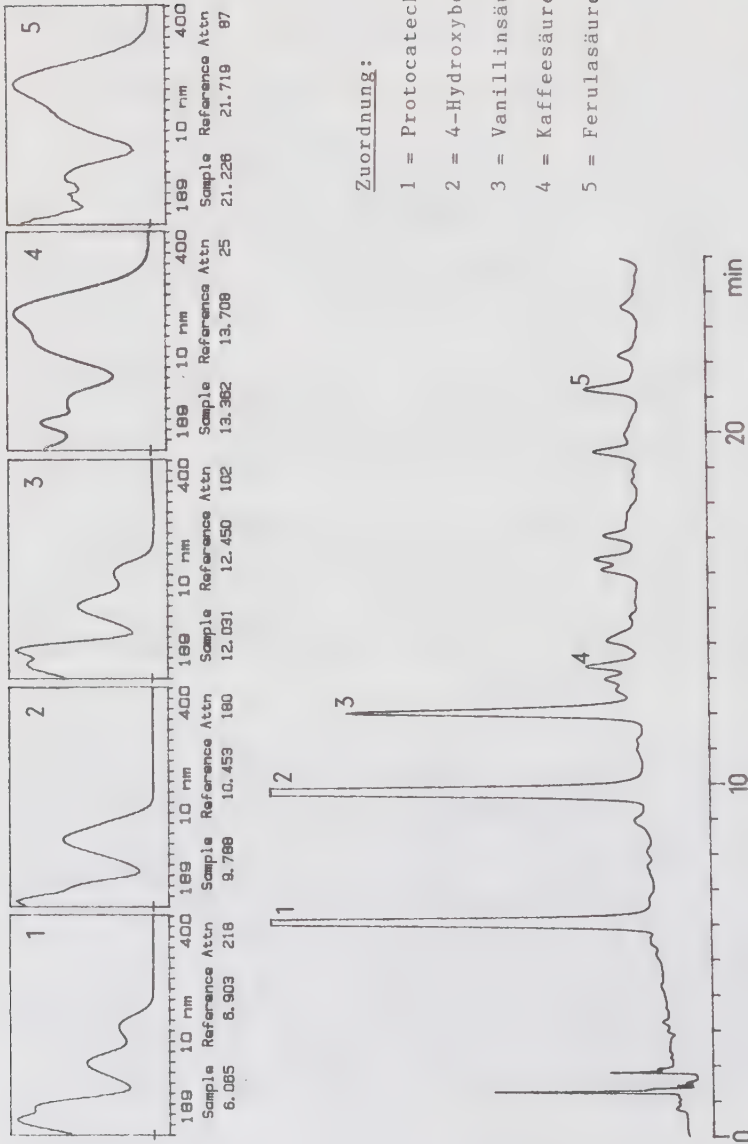


Abb. 46: HPLC-Fingerprint der EtOAc-Fraktion aus *Eichhornia crassipes* und Zuordnung der identifizierten Pflanzensäuren (Detektion: 254 nm, TS II, s. Exp. Teil IV. 5.2.4.)

Tabelle 25: Antihepatotoxische Aktivität der in *Eichhornia crassipes* nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT(%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100±2	100±2
4-Hydroxybenzoesäure	0,01	92±2	84±2*
	0,1	101±6	67±2**
	1,0	50±1**	66±2**
Vanillinsäure	0,01	101±2	84±3
	0,1	85±1*	77±3*
	1,0	66±1**	66±2**
Protocatechusäure s. Tabelle 24, S. 121			
Kaffeensäure s. (28)			
Ferulasäure s. (28)			

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle, $p < 0,01^*$ oder $p < 0,001^{**}$, $n=3$.

Im GalN-Schädigungsmodell wirkten 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Protocatechusäure dosisabhängig und etwa gleich stark. Auch die Ergebnisse für Zimtsäure und drei ihrer Derivate liegen in dieser Größenordnung (für 1 mg/ml 77-72% GPT). Jedoch ist Kaffeensäure sehr viel stärker aktiv als alle anderen bisher getesteten Benzoe- oder Zimtsäurederivate (bei 1 mg/ml 18% GPT), so daß für eine Wirkung gegen GalN-induzierte Schädigungen von Hepatozyten die ortho-Dihydroxygruppe am Zimtsäuregerüst wichtig zu sein scheint (28).

Die EtOAc-Fraktion war nur im GalN-Modell aktiv (GPT(%): 64 ± 1 , $p < 0,001$, mit CCl₄ 107 ± 7 , $n=3$, 1 mg/ml). Da die Konzentration der in *Eichhornia crassipes* nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren sehr gering war und somit nicht mit der gemessenen Aktivität der EtOAc-Fraktion korrelierte, müssen noch andere Substanzen an der Gesamtwirkung der Fraktion im GalN-Modell beteiligt sein.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Durch eine umfangreiche, Computer-gestützte Literaturrecherche wurde eine Liste der Drogen erstellt, denen in der Volksmedizin verschiedener Länder eine Leberwirksamkeit zugeschrieben wird. Außerdem wurde eine Übersicht über bekannte Wirkprinzipien aus Drogen zusammengestellt.

Für die vorliegende Arbeit wurden fünf aus Asien und Südamerika stammende "Leberdrogen" ausgewählt und phytochemisch sowie pharmakologisch auf ihre Leberwirkung hin untersucht.

1. Aus den in Indien bei Leberstörungen eingesetzten Blüten des Baumes Butea monosperma (Lam.) Taub. wurden aus einer antihepatotoxisch wirksamen Butanol-Ausschüttelung zwei Flavonoide durch präparative Schichtchromatographie und präparative HPLC isoliert. Durch spektroskopische Methoden und Mikrohydrolyse wurden Flavonoid 1 als Chalkondiglucosid Isobutrin und Flavonoid 2 als dazu isomeres Flavanondiglucosid Butrin identifiziert.

Im Hepatozyten-Test waren beide Flavonoide gegen GalN-induzierte Schädigungen wirksam, wobei Isobutrin etwa doppelt so stark wirkte wie Butrin. Da Isobutrin auch die RNA-Synthese im in vitro-System mit isolierten Rattenleberzellkernen stärker stimulierte als Butrin, kann es als Wirkprinzip der Droge angesehen werden. In beiden Testmodellen wirkte das Chalkon stärker als Silybin. Die quantitative HPLC-Bestimmung von Isobutrin ergab eine Korrelation zwischen der Wirkung der Butanol-Fraktion im GalN-Testmodell und ihrem Isobutrin-Gehalt (50%).

2. Aus der in der indischen Erfahrungsheilkunde gegen verschiedene Lebererkrankungen eingesetzten Asteracee Eclipta alba (L.) Hassk. wurde eine Ethylacetat-Fraktion gewonnen, die im Screening-Test die stärkste antihepatotoxische Wirkung aller bisher getesteten Extrakte bzw. Fraktionen zeigte. Aus dieser Fraktion wurden durch Säulenchromatographie drei Verbindungen isoliert. Die Verbindung El wurde als Apigenin

identifiziert. Die Strukturen der Verbindungen E2 und E3 wurden mit spektroskopischen Methoden (UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$) geklärt. E2 war mit Wedelolacton identisch und bei E3 handelte es sich um Desmethylwedelolacton. Entgegen früheren Befunden war damit die Isolierung dieser beiden Coumestane auch aus der getrockneten Droge gelungen.

Außerdem konnten wir in der Fraktion Protocatechusäure, 4-Hydroxybenzoesäure und eine Isochlorogensäure-Fraktion nachweisen. Mit Hilfe der HPLC wurde ein Fingerprint der wirksamen Fraktion erstellt und eine Gehaltsbestimmung der Coumestane durchgeführt. Zwei verschiedene Drogenmuster unterschieden sich hauptsächlich im Gehalt an Desmethylwedelolacton (3,5 bzw. 10,9 %).

Nach den Ergebnissen des Hepatozyten-Tests waren Wedelolacton und Desmethylwedelolacton die Hauptwirkprinzipien der Ethylacetat-Fraktion. Die Verbindungen gehören zu den in diesem Test wirksamsten Naturstoffen. Eine antihepatotoxische Wirkung ist bisher noch für keinen Vertreter der Coumestane beschrieben worden.

Die Ethylacetat-Fraktion zeigte in vivo und in vitro eine bemerkenswerte Anti-Phalloidin-Wirkung. Da auch eine starke in vitro-Stimulierung der RNA-Synthese nachgewiesen werden konnte, hat diese Fraktion ein ähnliches Wirkprofil wie Silybin. Im Hepatozyten- und RNA-Test wirkte sie jedoch wesentlich stärker.

Wedelolacton erwies sich im Lipoxigenase-Test auch als starker Hemmstoff der Leukotrien-Biosynthese.

3. In der mit *Eclipta alba* sehr eng verwandten Asteracee Wedelia calendulacea Less., die volksmedizinisch ähnlich eingesetzt wird, konnte in einer vergleichsweise schwächer wirkenden Ethylacetat-Fraktion außer Wedelolacton erstmals auch Desmethylwedelolacton nachgewiesen werden. Der Coumestangehalt der Fraktion war jedoch sehr gering.

4. Das Wirkprinzip der Droge Lophophytum leandri Eichl. (Flor de Piedra), die in der Homöopathie u.a. als Lebertherapeutikum eingesetzt wird, konnte in der Ethylacetat-Fraktion lokalisiert werden. Hieraus wurde Protocatechusäure als neue Verbindung isoliert und identifiziert. Außerdem wurden die Flavonoide Naringenin, Eriodictyol, Taxifolin, Naringenin-7-glucosid und Eriodictyol-7-glucosid chromatographisch nachgewiesen. Mit Hilfe der HPLC wurde der Gehalt an Protocatechusäure und allen Flavonoiden im Methanolextrakt und in der Ethylacetat-Fraktion bestimmt. Die Fraktion enthielt einen hohen Gehalt an Protocatechusäure (6,2 %) und Flavanonglykosiden (4,7 bzw. 9,6 %).

Nach den Ergebnissen des Hepatozyten-Tests sind Protocatechusäure und die fünf Flavonoide die Wirkprinzipien der Droge.

5. Aus der tropischen Wasserpflanze Eichhornia crassipes (Mart.) Solms, die in der Homöopathie als Pankreasmittel eingesetzt wird, wurden Protocatechusäure, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure und Ferulasäure angereichert und identifiziert. Die im Hepatozyten-Test nur gegen GalN-induzierte Zytotoxizität aktive Ethylacetat-Fraktion enthielt als Hauptverbindungen die drei Hydroxybenzoesäurederivate. Diese waren im Hepatozyten-Test teilweise stark wirksam, lagen allerdings nur in geringer Konzentration vor (0,7-1,7 %). Den Hauptprozentbestandteil der Droge macht jedoch die nicht näher untersuchte lipophile Fraktion aus.

Von den wirksamen Fraktionen der fünf Drogen wurde jeweils ein charakteristischer HPLC-Fingerprint erstellt, mit dem eine Identitätsprüfung der einzelnen Drogen möglich ist. Außerdem wurden mit Hilfe der HPLC Gehaltsbestimmungen der als Hauptwirkstoffe erkannten Verbindungen durchgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft des Drogenmaterials

Butea monosperma (Kapitel 3)

Getrocknete Blüten von Zandu Pharm. Works Ltd., Bombay, Indien, geliefert 1981

Eclipta alba (Kapitel 4 A)

Getrocknete oberirdische Teile mit Blütenständen und Samen

- 1. Charge: Himalaya Drug Co., Bangalore, Indien (1981)
- 2. Charge: Zandu Pharm. Works Ltd., Bombay, Indien (1981)

Wedelia calendulacea (Kapitel 4 B)

Pulverisierte oberirdische Teile von Pharm. Products P. Ltd., Thanjavur, Indien, geliefert 1981

Lophophytum leandri (Flor de Piedra) (Kapitel 5)

Pulverisierte, getrocknete Knollen (mit größeren Bruchstücken) von Dr. W. Schwabe, Karlsruhe, geliefert 1981

Eichhornia crassipes (Kapitel 6)

- Frischpflanzenansatz (1:1 in Ethanol), geliefert im Herbst 1984
 - Getrocknete Blätter, geliefert im Winter 1985
- von Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Eclipta alba und Wedelia calendulacea (Kapitel 4)

Wedelolacton von Prof. Halim, Mansoura, Ägypten

synthetisches Wedelolacton von Dr. S. Antus, Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Budapest, Ungarn

Apigenin, Protocatechusäure, 4-Hydroxybenzoesäure und Iso-chlorogensäuren von Fa. Roth, Karlsruhe

Apigenin-7-glucosid, Luteolin-7-glucosid und Luteolin aus der Vergleichssubstanzensammlung des Institutes

Luteolin auch von Fa. Roth, Karlsruhe

Lophophytum leandri (Kapitel 5)

Protocatechusäure, Eriodictyol, (+)-Catechin, Naringenin-7-glucosid und Eriodictyol-7-glucosid von Fa. Roth, Karlsruhe
Naringenin von Fa. Sigma, Deisenhofen

(-)-Epicatechin von Fa. Aldrich, Steinheim

Taxifolin und Quercetin aus der Testsubstanzensammlung des Institutes

Eichhornia crassipes (Kapitel 6)

Vanillinsäure von Fa. Merck, Darmstadt

Ferula-, 4-Hydroxybenzoe- und Protocatechusäure von Fa. Roth, Karlsruhe

Stigmasterol, p-Coumar- und Kaffeesäure sowie weitere Säure- und Säureester-Vergleichssubstanzen aus der Testsubstanzen-sammlung des Institutes

III. Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Adsorbentien

für die analytische DC

- Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck, Darmstadt (Art. Nr. 5715)
- Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC-Platten), 10 x 10 cm, Fa. Merck
- Reversed-Phase RP18 F_{254S}-Fertigplatten, 5 x 10 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck (Art. Nr. 15685)

für die präparative DC

- Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, Fa. Merck (Art. Nr. 5744)

Die Platten wurden wie jeweils bei IV. angegeben vorentwickelt (mindestens viermal).

Bei der Durchführung der präparativen Schichtchromatographie wurden ausschließlich Lösungsmittel von p.a.-Qualität verwendet, auch zum Vorentwickeln der Fertigplatten.

1.2. Auftragetechnik

analytisch: bandförmig mit ausgezogenem Schmelzpunktsröhrchen

präparativ: bandförmig mit schablonegeführter Mikroliterpipette, die unten mit einem kleinen Wattepfropfen verschlossen wurde

2. Säulenchromatographie

2.1. Adsorbens

Kieselgel 60, Korngröße unter 0,063 mm (feiner als 230 mesh ASTM), Fa. Merck (Art. Nr. 7729)

2.2. Pack- und Verfahrenstechnik

Das Kieselgel wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel (siehe unter IV. bei den einzelnen Drogen) auf dem Magnetrührer zu einer gleichmäßigen, luftblasenfreien, nicht zu dünnflüssigen Suspension gerührt (mindestens 60 min). Die Suspension wurde dann in die schräggestellte Säule, die unten etwas Elutionsmittel (EM) enthielt, zügig und luftblasenfrei gegossen. Nach dem Aufrichten der Säule wurde der Hahn geöffnet und mit aufgesetzter Drucksäule so lange mit dem EM gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb (mind. über Nacht). Dann wurde die Oberfläche der Säule vorsichtig mit Seesand bedeckt (ca. 5 mm hoch). Die jeweiligen Fraktionen (s. IV.) wurden in möglichst wenig EM gelöst und mit Hilfe einer Pasteurpipette langsam auf die Säule aufgetragen. Nach vollständigem Einziehen und

mehrfachem Nachspülen wurde mit Seesand überschichtet und die Säule vorsichtig mit dem EM aufgefüllt. Zur Erhöhung des hydrostatischen Druckes und wegen der damit verbundenen Verkürzung der Elutionszeit und Verbesserung der Trennleistung wurde eine zweite mit dem EM gefüllte Drucksäule aufgesetzt. Eine konstante Füllhöhe in der Drucksäule wurde gewährleistet durch einen oben angebrachten Scheidetrichter, an den ein leichter Unterdruck angelegt wurde und der oben etwas in das EM der Drucksäule eintauchte. Nach Öffnung des Hahns floß das EM gleichmäßig nach.

Die Einzelheiten zu den verschiedenen durchgeführten säulenchromatographischen Anreicherungen werden bei den entsprechenden Drogen in IV. angegeben.

3. HPLC

3.1. Apparative Daten

Gerät (1): Pumpe: Perkin-Elmer Serie 3 B
Injektor: U 6 K, Fa. Waters
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer
Schreiber: Recorder 561, Fa. Perkin-Elmer

Gerät (2): Liquid Chromatograph HP 1090 und
HP 1040A Photodiodenarray-Detektor, kombiniert mit
HP 85B Tischcomputer,
HP 9121 Diskettenlaufwerk,
HP 3392A Integrator,
HP 7470A X-Y-Plotter
(Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)

3.2. Lösungsmittel

Alle für die HPLC verwendeten Lösungsmittel (Methanol und Acetonitril) waren ausschließlich von Chrom AR-Qualität der Fa. Promochem, Wesel.

Für die analytische HPLC an Gerät (1) war das Wasser demineralisiert. Für die semi-präparative HPLC an Gerät (1) sowie die HPLC an Gerät (2) war das Wasser zusätzlich destilliert.

4. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte wurden auf einer Kofler-Heizbank der Fa. Reichert, Wien, bestimmt und unkorrigiert angegeben.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit den UV-Spektrophotometern DB-GT der Fa. Beckman oder 550 SE der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen (Schichtdicke: 1 cm, Lösungsmittel: MeOH p.a.).

Außerdem wurden die UV-Spektren on-line während der HPLC-Trennung registriert (Photodiodenarray-Detektor HP 1040A, s. III. 3.1.).

IR-Spektren

Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt (Konzentration 1 mg/ 100 mg KBr) und die Spektren der Preßlinge mit dem AccuLab-1 Spektrophotometer der Fa. Beckman aufgenommen.

Massenspektren

Geräte:

- EI-MS: Massenspektrometer MS 30, Fa. AEI, Manchester
- FAB-MS: Massenspektrometer Kratos MS 80 RFA

¹H-NMR-Spektren

Die 80 MHz-Spektren wurden mit einem Bruker WP-80 Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

Alle Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München aufgenommen.

IV. Spezielle Arbeitsmethoden

1. Untersuchungen von BUTEA MONOSPERMA (Kapitel 3)

1.1. Extraktion und Ausschüttelung

Der Methanol-Extrakt (Soxhlet-Extraktion von 250 g getrockneten Blüten) und die Ethylacetat- und Butanol-Ausschüttelungen waren 1983 an unserem Institut, wie bei (6) angegeben, hergestellt worden.

1.2. DC-Untersuchungen

Laufmittel:

LM I : Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser 100:11:11:26
(allgemeines Laufmittel für Flavonoidglykoside (125))

LM II : Methanol-Wasser 3:7 *

LM III: Methanol-Wasser 1:1 *

LM IV : Chloroform-Methanol-Wasser 64:40:8

(LM zum Nachweis der Zucker nach Mikrohydrolyse)

* LM II und III wurden zur DC auf RP18-Platten verwendet (s. III. 1.1.). Die Platten wurden wegen der stark wasserhaltigen LM 15 min bei 120° im Trockenschrank aktiviert.

Detektion:

- auf Kieselgel F₂₅₄-Platten: Fluoreszenzminderung im UV 254 nm
- Eigenfluoreszenz im UV 365 nm

Sprühreagentien:

Die Platten wurden nach Entwicklung gründlich abgefönt und nach Betrachten im UV (s.o.) mit einem der folgenden Reagentien besprüht:

1) Naturstoff (NST)/PEG-Reagens

Die Platten werden nacheinander mit einer Lösung von Diphenylborsäure- β -aminoethylester (NST, 1% in MeOH) und PEG 4000 (5% in EtOH) besprüht und im vis und UV 365 nm ausgewertet..

2) Eisen-III-chlorid-Reagens

Die Platten werden mit einer 5%igen methanolischen Lösung von FeCl_3 besprüht und im vis ausgewertet.

3) NH_3 (110, 111):

Die Platten werden mit konz. Ammoniak bedampft und im vis betrachtet.

4) Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagens

2g Anilin und 2g Diphenylamin werden mit 10 ml 85% Phosphorsäure gemischt und in MeOH ad 100 ml gelöst. Nach dem Besprühen werden die Platten 10 min bei 120° erhitzt. Die Auswertung erfolgt im vis (Nachweis der Zucker nach Mikrohydrolyse von Flavonoid 1 und 2).

1.3. Analytische HPLC

TS I : Trennung der BuOH-Fraktion

apparative Daten: Gerät (1) (s. III. 3.1.)

Säule: μ -Bondapak C18, Stahlsäule 300 x 4 mm
ID (10 μm), Fa. Waters

Fließmittel: Methanol-Wasser 35:65 (isokratisch)

Detektion: 254, 270, 375 nm (range 0,04)

Durchfluß: 2 ml/min

Papiervorschub: 5 mm/min

Einspritzmenge: 5-10 μl einer 0,1%igen Lösung

TS III: Aufnahme der UV-Spektren von Flavonoid 1,2 und 3

gegenüber TS I veränderte Parameter:

apparative Daten: Gerät (2) (s. III. 3.1.)

Detektion: 254, 220, 200 nm

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: 15 μl einer 0,1%igen Lösung der BuOH-Fraktion

(Abb. 17a, S. 54)

TS IV: Fingerprint der BuOH-Fraktion

Reinheitsprüfung der Eichsubstanz Isobutrin

Quantitative Bestimmung von Isobutrin

apparative Daten: Gerät (2)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 100CH-18/2 (5 μ m),
125 x 4 mm ID, Fa. Merck

Fließmittel: A: Wasser mit 10 ml 0,1N Phosphorsäure/l
B: Acetonitril mit 10 ml 0,1N Phos-
phorsäure/l

Gradient: von 10% B nach 30% B in 20 min, linear

Detektion: Fingerprint: 210, 254, 300, 375 nm
Reinheitsprüfung: 210 nm

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: Fingerprint: 5-8 μ l einer 0,04%igen Lö-
sung (BuOH-Fr. u. MeOH-Ex.)
Reinheitsprüfung: 3-5 μ l einer 0,02%igen
Lösung von Isobutrin

1.4. Isolierung von Flavonoid 1 und Flavonoid 2

1.4.1. Semi-präparative HPLC

TS II: apparative Daten: Gerät (1)

Säule: μ -Bondapak C18, Stahlsäule 300 x 7,9
mm ID (10 μ m), Fa. Waters

Fließmittel: Methanol-Wasser 40:60 (isokratisch)

Detektion: 254 nm (range 0,04 oder 0,1)

Durchfluß: 2 ml/min

Papiervorschub: 5 mm/min

Die BuOH-Fraktion wurde als 2%ige membranfiltrierte Lösung (in MeOH p.a.) eingespritzt. Pro Durchlauf wurden zwischen 40 und maximal 49 μ l injiziert und die Peaks nach dem Detektorsignal aufgefangen. Zur Entfernung des Methanolanteils wurden die Fraktionen am Rotavapor (Temperatur $<40^{\circ}$) auf etwa 60% ihres ursprünglichen Volumens eingeeengt. Die verbleibende Wasserphase wurde gefriergetrocknet. Die Ausbeuten sind im Allg. Teil, S. 33 angegeben.

1.4.2. Präparative Schichtchromatographie

Auf 6 Platten (s. III. 1.1.), die insgesamt fünfmal vorentwickelt wurden (3 mal mit MeOH und 2 mal mit 80%igem MeOH), wurden 31 mg BuOH-Fraktion aufgetragen. Nach Entwicklung der Platten in LM I bis zu einer Laufhöhe von 15 cm wurden sie bis zum völligen Verschwinden des Säuregeruchs kalt abgefönt und anschließend die Zonen von Flavonoid 1 (Rf 0,28) und 2 (Rf 0,19) im UV 254 markiert. Die Zonen wurden ausgekratzt und das Kieselgel dreimal mit MeOH eluiert (jeweils mindestens 60 min Rühren auf dem Magnetrührer). Das Eluat wurde durch eine D4-Glasfritte vom Kieselgel abfiltriert und zur Entfernung der restlichen Kieselgelpartikel membranfiltriert (Sartorius Typ SM, Porengröße 5 µm). Nach vollständigem Einengen am Rotavapor wurden die Substanzen in 10%igem Methanol gelöst und mit Hilfe einer Glasspritze auf eine mit MeOH gespülte Sep-Pak C18-Kartusche (Fa. Waters) gegeben. Flavonoid 1 konzentrierte sich als orangefarbene Zone und Flavonoid 2 als gelbe Zone am obersten Rand der Kartusche. Diese wurde mit 12 ml 10%igem MeOH gespült (zur Entfernung hydrophiler Kleberkomponenten). Anschließend wurden die Flavonoide 1 und 2 mit reinem MeOH eluiert. Dabei wurde das Eluat ab dem ersten orangenen bzw. gelben Tropfen auf einem Uhrglas aufgefangen. Nach vorsichtigem, kalten Abfönen wurden die Substanzen mit Hilfe einer Rasierklinge abgekratzt. Die Ausbeuten sind im Allg. Teil, S. 35, angegeben. DC-Überprüfung der Spüllösung (10% MeOH) ergab keinen Verlust an Flavonoid 1 oder 2.

1.5. Mikrohydrolyse auf der DC-Platte (137)

Nach dem Auftragen von Flavonoid 1 und 2 wurde die DC-Platte so in eine etwa 1 cm hoch mit konzentrierter Salzsäure gefüllte Glaskammer gestellt, daß sie nicht mit der Säure in Berührung kam. Die Kammer wurde 30 min in einen Trockenschrank bei 100°C gestellt. Anschließend wurde die Platte aus der HCl-Atmosphäre entfernt und mindestens 40 min unter dem Abzug abgefönt. Nach dem Auftragen der unzersetzten Flavonoide 1 und 2 sowie verschiedenen Zucker-Vergleichssubstanzen wurde die Platte in LM IV entwickelt. Detektiert wurde mit dem Di-

phenylamin-Phosphorsäure-Reagens. Die Mikrohydrolyse verlief quantitativ.

Rf(DC): Flavonoid 1 (unzersetzt): 0,3 (gelbgrün/vis)
Flavonoid 2 (unzersetzt): 0,32 (blaugrün/vis)
D-Glucose (vor und nach Mikrohydrolyse): 0,21 (blau/vis)

1.6. Physikalische Daten

1.6.1. Flavonoid 1 (Isobutrin)

$C_{27}H_{32}O_{15}$ (596,53) MG gef.: 596
Smp.: 185-188°C (Lit. (111,113): 190-192° (Z))
Rf (DC): 0,32 (LM I), 0,1 (LM II), 0,44 (LM III)
Rt (HPLC): 9 min (TS I), 21 - 28 (TS II), 11,4 (TS III),
12,7 (TS IV)
UV (Diodenarray): $\lambda_{max.}$ = 243(sh), 255(sh), 300(sh), 375 nm
(MeOH): 245(sh), 260, 305(sh), 375 nm
(+NaOAc): 255, 280, 445 (+) nm
(+NaOMe): 255, 282, 445 (+) nm
(+AlCl₃): 268, 315, 385(sh), 435 (+) nm
(+AlCl₃/HCl): 268, 316, 376, 423 nm
((+) = Hyperchromie von Bande I)
IR (KBr): ν = 3400 - 3340, 2920, 1635, 1580, 1510 (d),
1365, 1215, 1070, 850, 800 cm⁻¹
NFAB-MS: (4 kV, 10⁻⁵ Torr, 30 s/d, Ar 7 keV, DE,
Matrix:Glycerin)
m/z = 595, 433, 271, 243, 205
(s. Abb. 8, S. 38)
¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆, +TFA-d, TMS int.)
s. Abb. 10, S. 40 und Tab. 7, S. 41

1.6.2. Flavonoid 2 (Butrin)

$C_{27}H_{32}O_{15}$ (596,53) MG gef.: 596
Smp.: 190°C (Lit. (111): 194-195° (Z))
Rf (DC): 0,2 (LM I), 0,4 (LM II), 0,74 (LM III)
Rt (HPLC): 2,6 min (TS I), 5,5 - 8 (TS II), 3,6
(TS III), 6,6 (TS IV)

UV (Diodenarray): $\lambda_{\text{max.}}$ = 215, 226, 271, 315 nm
(MeOH): 230, 270, 314 nm
(+AlCl₃): 270, 314, 363 nm
(+AlCl₃/HCl): 270, 314, 363 nm
IR (KBr): ν = 3400 - 3300, 2900, 1660, 1600, 1510.
1440, 1250, 1190, 1160, 1070, 890 cm⁻¹
(s. Abb. 13, S. 44)
NFAB-MS: (4 kV, 10⁻⁵ Torr, 30 s/d, Ar 7 keV, DE,
Matrix:Glycerin)
 m/z = 595, 433, 273, 271, 255, 225
(s. Tab. 8, S. 44)
¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆, +TFA-d, TMS int.)
s. Tab. 9, S. 45

1.6.3. "Flavonoid 3"

Rf (DC): 0,25 (LM I), 0,17 (LM II), 0,5 (LM III)
Rt (HPLC): 6,3 min (TS I), 15 - 18 (TS II), 8 (TS III)
UV (Diodenarray): $\lambda_{\text{max.}}$ = 216, 230, 277, 319 nm

1.7. Quantitative HPLC-Bestimmung von Isobutrin

Verwendet wurde TS IV. Für die Eichgerade wurden 1-5 µl einer 0,02%igen Lösung von Isobutrin (isoliert nach IV. 1.4.2., 1,00 mg ad 5,0 ml im Meßkölbchen, Reinheitsprüfung: TS IV) eingespritzt und die zugehörige Peakfläche integriert. Bei der verwendeten Detektionswellenlänge von 375 nm erschien der Isobutrin-Peak ohne Schultern (vgl. Abb. 17b, S. 54, Det. bei 254 nm). Die ermittelten Flächeneinheiten wurden als Funktion der Einspritzmenge (x) betrachtet und die Ausgleichsgerade (lineare Regressionskurve) mit Hilfe eines Computerprogramms berechnet. Aus der Geradengleichung ergibt sich durch Umformung die auf S. 57 angegebene Gleichung, durch die die der Fläche (y) entsprechende Menge Isobutrin (x) errechnet werden konnte.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Isobutrin in der BuOH-Fraktion sind in Tab. 11, S. 57 angegeben. Die Prozentgehalte beziehen sich auf das Trockengewicht der Fraktion (Trocknung im Exsikkator über Blaugel).

Der MeOH-Extrakt wurde als 0,04%ige Lösung eingespritzt (wie die BuOH-Fraktion 2,00 mg ad 5,0 ml mit MeOH p.a. im Meßkolben). Bei der analog durchgeführten Gehaltsbestimmung erhielten wir folgende Werte:

Tabelle 26: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Isobutrin im MeOH-Extrakt

Best.	eingespr. Menge Ex. (µg)	Flächen- einheiten (x10 ⁶)	Menge Isobutrin (µg)*	Gehalt (%)
1	2,0	2,0933	0,428	21,40
2	2,4	2,5555	0,519	21,63
3	2,4	2,5436	0,517	21,54
4	2,8	2,9719	0,602	21,50
5	2,8	2,9868	0,605	21,61
6	3,2	3,3914	0,685	21,41

$$\bar{x} = 21,52$$

$$S = 0,0095$$

$$s = 0,0973$$

$$\Delta\bar{x} = 0,0397$$

$$s_{\text{rel.}} = 0,45 \%$$

* Errechnet nach der auf S. 57 angegebenen Gleichung

2. Untersuchungen von ECLIPTA ALBA (Kapitel 4 A)

2.1. Extraktion

475 g gepulverte Droge wurden im Soxhlet 6 Tage lang mit MeOH extrahiert. Nach vollständigem Einengen der methanolischen Lösung am Rotavapor (Temperatur ca. 50°) blieben 103 g Extrakt zurück.

2.2. Ausschüttelung

Zur Entfernung von Chlorophyll und weiteren Ballaststoffen stellte sich das Digerieren mit Wasser als beste Methode heraus. Dazu wurde der MeOH-Extrakt in Wasser suspendiert und in einer großen Abdampfschale 30 min lang auf einem Dampfbad digeriert. Dabei überstieg die Temperatur niemals 80°C. Nach Filtration der warmen Lösung wurde die Wasserphase fünfmal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach dieser Behandlung waren in der Wasserphase die Zonen E1 - E3 nicht mehr nachweisbar (DC in LM I). Bei dem Ausschütteln wurde darauf geachtet, nur die klare EtOAc-Fraktion ohne Schwebstoffe abzutrennen. Die EtOAc-Fraktion wurde 12 h lang über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und vollständig zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 3,2 g eines hellbraunen Pulvers (= EtOAc 1)

2.3. Dünnschichtchromatographie

Laufmittel:

LM I : Toluol-Aceton-Ameisensäure 11:6:1

LM II : DCM-Methanol-Wasser 14:9:4 (Unterphase)
(säurefreies System für die SC)

LM III: Toluol-Aceton-Ameisensäure 15:5:1

LM IV : DCM-Aceton 100:5
(LM für E2- und E3-Peracetat)

LM V : Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser 100:11:11:26
(Identifizierung von E4 und E5 als Isochlorogensäuren)

Nach Auswertung der getrockneten Platten im UV 254 und 365 nm wurden sie mit FeCl₃- oder NST/PEG-Reagens (s. IV. 1.2.) bzw. Echtblausalz-Reagens besprüht (0,5 g Echtblausalz werden in 100 ml Wasser gelöst. Nach Besprühen mit dem frisch hergestellten Reagens werden die Platten in vis ausgewertet).

Folgende Rf-Werte wurden erhalten:

	E 1	E 2	E 3
LM I	0,6	0,53	0,45
LM II	0,71	0,63	0,5
LM III	0,5	0,4	0,28
RP18-Platten, LM 40%iges Acetonitril	0,17	0,28	0,44

2.4. Isolierung von E1 - E3

2.4.1. Säulenchromatographie

2 g EtOAc-Fraktion wurden auf einer vorbereiteten Kieselgelsäule wie unter III. 2.2., S. 139, beschrieben, aufgetragen (Durchmesser der Säule: 40 mm, Füllhöhe: 300 mm). Als Elutionsmittel diente das empirisch ermittelte System DCM-Methanol-Wasser 14:9:4 (Unterphase) (LM II). Das Eluat wurde zu je 13,5 ml aufgefangen (Fraktionierung alle 45 min) und die einzelnen Fraktionen wurden chromatographiert (LM I und II). Die nach der DC identischen Gläschen wurden vereinigt und vollständig eingengt.

Auf die gleiche Weise erfolgte die Auftrennung von 1 g EtOAc-Fraktion, die 1983 nach (6) hergestellt worden war.

Folgende Fraktionen und Ausbeuten wurden erhalten:

	aus EtOAc nach (6)		aus EtOAc 1	
	1 - 11	verworfen	1 - 15	verworfen
E 1	12 - 14	46,7 mg	16 - 18	125 mg
E 1 + E 2	15 + 16	28 mg	19 - 24	258 mg
E 2	17 - 27	128 mg	25 - 38	292 mg
E 3	28 - 41	66,3 mg	39 - 75	200 mg

Nach DC-Prüfung (HPTLC-Platten) waren die E1- und E2-Fractionen rein (LM I - III), so daß sie nicht weiter gereinigt werden mußten.

Die in Tab. 19, S. 92, angegebene "angereicherte E3-Fraktion" ist die Fraktion 28 - 41.

2.4.2. Präparative Schichtchromatographie von E 3

Die Reinigung von E3 erfolgte durch Aufarbeitung der Fraktionen 39 - 75. Die Fraktion wurde wie beschrieben auf insgesamt 21 Platten aufgetragen (s. III. 1.1.), die vorher je zweimal mit MeOH und Aceton vorentwickelt waren. Nach Entwicklung der Platten in LM I wurde bis zum vollständigen Verschwinden des Säuregeruchs kalt abgefönt, die Zone E3 im UV 365 nm markiert und ausgekratzt. Das Kieselgel wurde auf dem Magnetrührer dreimal 60 min mit Aceton p.a. eluiert und anschließend durch eine Glasfritte D4 filtriert und membranfiltriert (Sartorius Membranfilter, Porengröße 0,45 µm). Die Lösung wurde vollständig eingengt. Nachelution mit Aceton-Methanol 1:1 brachte keine weitere Desorption von E3.

Auf diese Weise wurden aus 195 mg Fraktion 39 - 75 insgesamt 36 mg E3 als grünes Pulver erhalten.

2.5. Acetylierung

11 mg E2 wurden in einem Spitzkolben in 0,5 ml Pyridin p.a. gelöst und mit 2 ml Acetanhydrid p.a. versetzt. Der Kolben wurde dicht verschlossen und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde durch Probe-DC des Reaktionsansatzes verfolgt (LM IV). Nach 30 Stunden wurden 7 ml eisgekühltes Wasser zugegeben und der Kolben etwa 3 h auf Eis stehengelassen. Vom ausgefallenen Niederschlag wurde abgesaugt. Dazu wurde der Reaktionsansatz in eine Pasteurpipette mit vergrößerter Öffnung aufgezogen und tropfenweise auf ein kleines Filterpapier gegeben, wobei ein leichter Unterdruck angelegt wurde. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wurde mit mindestens 10 ml eisgekühltem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Exsikkator wurden 9 mg eines beigefarbenen Pulvers abgekratzt.

Die Reinigung des E2-Rohacetats erfolgte durch eine kleine, vorbereitete Kieselgelsäule (hier ausnahmsweise Kieselgel 60, 70-230 mesh, Fa. Merck; Durchmesser der Säule: 7 mm, Füllhöhe: 250 mm). Nach dem Auftragen des in DCM p.a. gelösten Rohacetats wurde mit DCM-Aceton 100:5 (LM IV) eluiert. Die aufgefundenen Fraktionen wurden chromatographiert. Nach 8,5 ml (verworfen) erschien E2-Acetat im Eluat (insgesamt 7,5 ml). Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels verblieben 3 mg eines weißen Pulvers.

6 mg E3 wurden in 1 ml Pyridin p.a. und 1 ml Acetanhydrid p.a. gelöst. Die Umsetzung wurde nach 5, 10 und 20 h kontrolliert (LM IV und DCM-Aceton 95:5). Nach 24 h wurden 5 ml eisgekühltes Wasser zugegeben und nach weiterem 3-stündigen Stehenlassen des Kolbens auf Eis wurde wie oben beschrieben der Niederschlag abgetrennt. Wir erhielten 5 mg einer beigefarbenen Substanz.

2.6. Physikalische Daten

2.6.1. E 1 (Apigenin)

$C_{15}H_{10}O_5$ (270,23)	MG gef.: 270
Rf (DC):	s. S. 150
Rt (HPLC):	s. S. 158
UV (Diodenarray und MeOH):	$\lambda_{max.} = 267, 295(sh), 335 \text{ nm}$
(+AlCl ₃):	275, 301, 348, 384 nm
(+AlCl ₃ /HCl):	275, 301, 340, 381 nm
(+NaOAc):	275, 302(sh), 377 nm
(+NaOAc/H ₃ BO ₃):	267, 302(sh), 338 nm
	(identisch mit Werten nach (127))
IR (KBr):	$\nu = 3300, 1650, 1605, 1580, 1490,$ $1350, 1275, 1240, 1170, 1020,$ 820 cm^{-1}
	(Überlagerungsspektrum mit authentischem Apigenin)

EI-MS: (4 kV, 70 eV, 50 μ A, 3 s/d, ST 200^o)
 m/z (rel.Int.%): 270 (M⁺)(50), 242
 (M-CO)(10), 153 (Retro-Diels-Alder-
 Fragment (A₁+H))(42), 152 (A₁)(51),
 124 (A₁-CO)(69), 123 (A₁-CHO)(69),
 121 (B₂)(100)

2.6.2. E 2 (Wedelolacton)

C₁₆H₁₀O₇ (314,24) MG gef.: 314
 Rf (DC): s. S. 150
 Rt (HPLC): s. S. 158
 UV (Diodenarray und MeOH): $\lambda_{\text{max.}}$ = 235(sh), 249, 302(sh), 351 nm
 (+NaOMe): 272, 310, 378 (-) nm
 (+NaOAc): 277, 310, 378 (-) nm
 (+NaOAc/H₃BO₃): 255, 292(sh), 307(sh),
 360 nm
 (+AlCl₃): 243(sh), 255(sh), 300,
 371, 445 nm
 (+AlCl₃/HCl): 243(sh), 250(sh), 300,
 351, 445 nm
 ((-) bedeutet Hypochromie)
 IR (KBr): ν = 3300(breit), 2940, 1710, 1610,
 1445, 1320, 1280, 1200, 1150,
 1080, 900, 810 cm⁻¹
 (Abb. 24, S. 72)

EI-MS: (4 kV, 70 eV, 50 μ A, 3 s/d, ST 200^o)
 m/z (rel.Int.%): 314 (M⁺)(100), 299
 (22), 243 (31), 187 (40)
 (s. Tab. 16, S. 77)

E 2-Peracetat (Wedelolactontriacetat)

C₂₂H₁₆O₁₀ (440,35) MG gef.: 440
 Smp.: 235^oC (Lit. (204): 235-237^o,
 (207): 243-244^o)
 Rf (DC): 0,7 (LM IV)

EI-MS: (4 kV, 70 eV, 50 μ A, 3 s/d, ST 200⁰)
 m/z (rel.Int.%): 440 (M⁺)(8), 398
 (14), 356 (35), 314 (100), 313 (24),
 299 (5), 285 (12), 243 (7), 95 (52)
 (s. Abb. 27, S. 76 und Tab. 16, S. 77)

¹H-NMR: (80 MHz, CDCl₃, TMS int.)
 δ (ppm) = 2,33 (s, 6H, 2 -OAc), 2,5
 (s, 3H, -OAc), 3,91 (s, 3H, C7-
 OCH₃), 6,73 (d, 1H, J = 2 Hz, H-6),
 6,91 (d, 1H, J = 2 Hz, H-8), 7,51
 (s, 1H, H-13), 7,9 (s, 1H, H-10)
 (s. Abb. 29, S. 80 und Tab. 17, S. 81)

2.6.3. E 3 (Desmethylwedelolacton)

C₁₅H₈O₇ (300,21) MG gef.: 300

Rf (DC): s. S. 150

Rt (HPLC): s. S. 158

UV (Diodenarray und MeOH): $\lambda_{\text{max.}}$ = 235(sh), 249, 302(sh), 351 nm
 (+NaOMe): 275, 320, 372 (-) nm
 (+NaOAc): 250(sh), 275(sh), 310,
 372 (-) nm
 (+NaOAc/H₃BO₃): 255(sh), 273(sh), 308(sh),
 360 nm
 (+AlCl₃): 247(sh), 308, 365, 450 nm
 (+AlCl₃/HCl): 247(sh), 305(sh), 351 nm

IR (KBr): ν = 3300 - 3200, 1710, 1620 (d),
 1480, 1450, 1420, 1335, 1280,
 1150, 1080, 1060, 1020, 970,
 895, 810, 760 cm⁻¹
 (Abb. 24, S. 72)

EI-MS: (4 kV, 70 eV, 50 μ A, 3 s/d, ST 200⁰)
 m/z (rel.Int.%): 300 (M⁺)(100),
 150 (11), 121 (14), 69 (27)

¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆, +TFA-d, TMS int.)
 δ (ppm) = 6,45 (dd, 2H, J = 2 Hz,
 H-6 und H-8), 7,23 (s, 1H, H-13),
 7,33 (s, 1H, H-10)

E 3-Peracetat (Desmethylwedelolactontetraacetat)

$C_{23}H_{16}O_{11}$ (468,36)

MG gef.: 468

Smp.:

265°C (Lit. (160,184): 270-272°)

Rf (DC):

0,61 (LM IV)

IR (KBr):

$\nu = 3100, 2920, 1765$ (breit, Lacton- und Acetat-Carbonyl), 1630, 1600, 1480, 1455, 1430, 1370 (OAc), 1300, 1265, 1200 (breit, OAc), 1145, 1130, 1110, 1080, 1060, 1025, 960, 900, 880, 740 cm^{-1}

(Abb. 26, S. 74)

EI-MS:

(4 kV, 70 eV, 50 μA , 3 s/d, ST 200°)
 m/z (rel. Int.%): 468 (M^+)(6), 426 (19), 384 (36), 342 (59), 300 (100), 299 (29), 271 (9), 243 (6), 69 (101) (s. Abb. 27, S. 76 und Tab. 16)

1H -NMR:

(80 MHz, $CDCl_3$, TMS int.)
 δ (ppm) = 2,35 (s, 9H, 3 -OAc), 2,5 (s, 3H, -OAc), 7,03 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-6), 7,25 (d, überlagert mit $CHCl_3$ -Signal, $J = 2$ Hz, H-8), 7,55 (s, 1H, H-13), 7,94 (s, 1H, H-10)
(s. Abb. 29, S. 80 und Tab. 17, S. 81).

2.7. HPLC

TS I : Reinheitsprüfung von E1 - E3

Vergleich der Rt von Apigenin, Luteolin und Wedelolacton mit E1 und E2

Versuche zur Trennung der EtOAc-Fraktion

apparative Daten: Gerät (1) (s. III. 3.1.)

Säule: μ -Bondapak C18, Stahlsäule 300 x
4 mm ID (10 μ m), Fa. Waters

Fließmittel: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 24:76:1
(isokratisch)

Detektion: 240 und 254 nm (range 0,04)

Durchfluß: 2 ml/min

Einspritzmenge: Reinsubstanzen: 2-10 μ l einer 0,05%-
igen Lösung
EtOAc-Fraktion: 3-5 μ l einer 0,25%-
igen Lösung

TS II : Reinheitsprüfung von E1 - E3

Überspritzungsversuche

apparative Daten: Gerät (1)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 100CH-18/2
(5 μ m), 125 x 4 mm ID, Fa. Merck

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphor-
säure 60:40:1
B: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphor-
säure 10:90:1

Gradient: von 10% A nach 60% A in 25 min, linear
(= 15 - 40% Acetonitril)

Detektion: 220, 254, 351 nm (range 0,1 oder 0,04)

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: Reinsubstanzen: 1-5 μ l einer 0,05%-
igen Lösung
EtOAc-Fraktion: 5-8 μ l einer 0,1%-
igen Lösung

Protocatechusäure: Rt 2,7 min

4-Hydroxybenzoesäure: Rt 4,3 min

TS III: Trennung der EtOAc-Fraktion

Überspritzungsversuche

apparative Daten: Gerät (1)

Säule: μ -Bondapak C18 wie bei TS 1

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-Essigsäure
60:40:2
B: Acetonitril-Wasser-Essigsäure
10:90:2

Gradient: von 16% A nach 60% A in 30 min, linear
(= 18 - 40% Acetonitril)

Durchfluß: 1 ml/min

Detektion: 254 nm (range 0,04)

TS IV : Reinheitsprüfung von E2, E3 und der Wedelolacton-Vergleichssubstanzen (158,201)

Identifizierung der Hydroxybenzoesäuren und der Isochlorogensäure-Fraktion

Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion

Gehaltsbestimmungen

apparative Daten: Gerät (2)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 100CH-18/2
(5 μ m), 125 x 4 mm ID, Fa. Merck

Fließmittel: A: Wasser mit 10 ml 0,1N Phosphorsäure/l
B: Acetonitril mit 10 ml 0,1N Phosphorsäure/l

Gradient: von 15% B nach 40% B in 25 min, linear

Detektion: Fingerprint und Identifizierung der Säuren: 254 nm

Reinheitsprüfungen: 210, 200 nm

Quantitative Bestimmungen: 351 nm

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: Reinsubstanzen: 1-10 μ l einer 0,05%-igen Lösung

EtOAc-Fraktion: 10 μ l einer 0,1%igen Lösung

TS V : Identifizierung von Protocatechu- und 4-Hydroxybenzoesäure durch Überspritzen

apparative Daten: Gerät (1)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 wie bei TS IV

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphorsäure 55:45:1

B: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphorsäure 5:95:1

Gradient: von 0% A nach 30% A in 25 min, linear
(= 5 - 20% Acetonitril)

Detektion: 254 nm (range 0,1)

Durchfluß: 1 ml/min

Protocatechusäure: Rt 7 min

4-Hydroxybenzoesäure: Rt 11,2 min

Retentionszeiten in TS I - IV (min):

	E 1	E 2	E 3
TS I	16,4	11,2	4,6
TS II	24	19,8	13,2
TS III	25,2	21,8	13,8
TS IV	20,3	16,9	10,4

Die Rt von Protocatechusäure und 4-Hydroxybenzoesäure sind bei TS II und TS V angegeben.

Rt der Isochlorogensäure-Fraktion s. Allg. Teil, S. 86.

2.8. Quantitative Bestimmungen

2.8.1. Aufstellung der Eichgeraden

Die Eichgerade wurde erstellt nach Einspritzung von 1-10 µl einer 0,05%igen Lösung von Wedelolacton (158) (1,00 mg wurden ad 2,0 ml im Meßkolben mit MeOH p.a. gelöst) und Integration der jeweiligen Peakfläche (TS IV). Durch das Auftreten einer Schulter auf dem Peaktail mußte die Integratorfunktion so gewählt werden, daß die Fläche der Schulter durch Anlegen einer

Tangente nicht erfaßt wurde und gleichzeitig gewährt blieb, daß die Fläche bis zum Auslaufen des Tails vollständig integriert wurde (Integratorfunktion IF 3 (238)).

Die Ausgleichsgerade (Abb. 33, S. 88) wurde errechnet wie unter IV. 1.7. beschrieben.

2.8.2. Herstellung von EtOAc 2

Aus der 2. Drogencharge wurden 100 g pulverisierte Droge 4 Tage lang mit Methanol im Soxhlet extrahiert. Nach Filtration und vollständigem Einengen erhielten wir 16,2 g Extrakt. Dieser wurde in 300 ml Wasser aufgeschlämmt und 30 min lang wie bereits beschrieben digeriert (Temperatur: 60-70°C). Nach Abkühlen auf etwa 40°C wurde von den Ballaststoffen abfiltriert und die Wasserphase nach vollständigem Abkühlen fünfmal mit je 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einrotieren wurde 1 g braunes Pulver erhalten, das im Mörser fein verrieben wurde (= EtOAc 2)

2.8.3. Herstellung von EtOAc 3

Hier wurde ein schonenderes Verfahren zur Entfernung der Ballaststoffe angewandt.

200 g pulverisierte Droge (1. Charge) wurden 90 h lang extrahiert (MeOH, Soxhlet, Ausbeute: 29 g). Der Extrakt wurde in 400 ml Wasser suspendiert und mit 200 ml Petrolether ausgeschüttelt. Es löste sich nur ein geringer Teil der Ballaststoffe, das meiste verblieb als unlöslicher Rückstand an der Phasengrenze. Anschließend wurde zentrifugiert, die Petroletherphase mit einer Pipette abgezogen und die Wasserphase zusammen mit den abgeschiedenen Ballaststoffen in eine Abdampfschale überführt. Es wurde kurz digeriert: innerhalb 10 min wurde die wässrige Suspension auf 70°C erwärmt, 1 min bei dieser Temperatur gelassen und nach Abkühlen filtriert. Die Wasserphase wurde sechsmal mit je 150 ml EtOAc ausgeschüttelt. Ausbeute: 1,4 g braunes Pulver, das fein verrieben wurde (= EtOAc 3).

2.8.4. Coumestan-Bestimmung in EtOAc 1 - 3

Von den Fraktionen wurden jeweils 3, 5 und 10 µl einer Lösung von 5,00 mg ad 5,0 ml mit MeOH p.a. im Meßkölbchen unter denselben chromatographischen Bedingungen wie bei der Erstellung der Eichgeraden chromatographiert (TS IV). Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 18, S. 89, aufgeführt.

2.8.5. Coumestan-Bestimmung im MeOH-Extrakt

8,50 g pulverisierte Droge (1. Charge) wurden mit 200,0 ml MeOH im Soxhlet (Hülse: 22 x 80 mm) genau 24 h lang extrahiert. Ausbeute: 1,25 g grünes Pulver. 8,0 mg des trockenen, gleichmäßig verriebenen Extraktes wurden in 2 ml MeOH p.a. gelöst und 2 h unter gelegentlichem Umschütteln stehengelassen. Der Extrakt löste sich nicht vollständig (Ballaststoffe). Die "Lösung" wurde in eine Glasspritze aufgezogen und langsam durch eine vorher mit MeOH gespülte Sep-Pak RP18-Kartusche (Fa. Waters) gedrückt. Die Ballaststoffe verblieben am oberen Rand der Kartusche (dunkelgrüne Bande). Die Kartusche wurde ad 5,0 ml (Meßkölbchen) mit MeOH p.a. gespült. 20 µl dieser Lösung wurden in die HPLC eingespritzt und die Peakfläche von Wedelolacton integriert (s. Abb. 34, S. 90).

Ergebnis: Flächeneinheiten: $2,343 \times 10^6$, entsprechend 0,511 µg, 1,6% eingesetzter MeOH-Extrakt.

Weiteres Spülen der Kartusche mit MeOH und 10%igem MeOH brachte keine weitere Elution von Wedelolacton, so daß wir davon ausgingen, daß die Verbindung quantitativ erfaßt wurde.

2.9. Identifizierung der "Isochlorogensäure-Fraktion"

Hydrolyse:

ca. 20 mg EtOAc 1 wurden in wenig Wasser gelöst, im Spitzkolben mit 1 ml 1N KOH versetzt und 45 min auf einem Dampfbad hydrolysiert. Anschließend wurde mit 0,5N HCl auf pH 3 eingestellt und dreimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Diese EtOAc-Phase wurde chromatographiert (LM I und Ether-Toluol 1:1, gesättigt mit 10%iger Essigsäure), wobei Kaffeesäure mit

Hilfe einer Vergleichssubstanz nachgewiesen wurde (R_f 0,5 (LM I) bzw. 0,25, Detektion: UV und NST/PEG-Reagens)

HPLC:

Die Vergleichssubstanz wurde in TS IV chromatographiert. Die Retentionszeiten der Peaks und die on-line registrierten UV-Spektren wurden verglichen mit den entsprechenden Daten von EtOAc 2 (s. Abb. 31, S. 84. EtOAc 2 hat einen identischen Fingerprint).

3. Untersuchungen von WEDELIA CALENDULACEA (Kapitel 4 B)

3.1. Extraktion und Anreicherung

Die Extraktion und Anreicherung der Coumestane (EtOAc W1, W2 und W3) wurde nach dem auf S. 104 angegebenen Schema durchgeführt. Ein Digerieren des MeOH-Extraktes analog IV. 2.2. war nicht möglich, da eine wäßrige Suspension beim Erhitzen sehr stark schäumte und nach Abkühlen eine Art Gallerte bildete, die weder filtriert noch abgenutscht werden konnte. Auch nach kurzem Erhitzen (1 min) der mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzten wässrigen Suspension des MeOH-Extraktes ließ sich diese nicht filtrieren.

Schema A: Soxhlet mit Petrolether: 24 h

Soxhlet mit MeOH: 4 Tage, Ausbeute 28 g aus 265 g Droge

sechsmaliges Ausschütteln mit Ether (nach (204)), nach Zentrifugieren jeweils die Etherphase abziehen, Ausbeute: 14,7 g

Ausbeuten nach je viermaligem Ausschütteln mit EtOAc: 800 mg W1 und 300 mg W2

W2 wurde in MeOH gelöst und durch eine Sep-Pak-Kartusche filtriert, um letzte Reste an Chlorophyll zu entfernen

Schema B: Soxhlet (MeOH): 4 Tage, Ausbeute: 23,1 g aus 200 g Droge

Filtrierte Wasserphase fünfmal mit EtOAc ausschütteln, Ausbeute: 600 mg W3

3.2. Nachweis von Wedelolacton und Desmethylwedelolacton

3.2.1. DC

Co-Chromatographie mit E2 und E3 erfolgte in LM I, II und IV (s. IV. 2.3., S. 149).

3.2.2. Isolierung von Desmethylwedelolactonperacetat im Mikromaßstab

275 mg EtOAc W2 wurden auf 4 Platten zur präparativen DC aufgetragen (Vorentwicklung mit MeOH, 80% MeOH und zweimal mit Aceton). Die Platten wurden in LM I entwickelt. Weiter wurde wie bereits beschrieben verfahren (Eluens: Aceton). Die erhaltene, nicht völlig DC-reine Substanz (schmierige Konsistenz, ca. 3 mg) wurden im Spitzkolben mit je 1 ml Pyridin und Acetanhydrid p.a. versetzt. DC des Reaktionsgemisches nach 5 h ergab eine Zone, die mit E3-Acetat identisch war (LM IV). Nach 24 h wurden 7 ml eisgekühltes Wasser zugegeben. Es trat eine schwache Trübung, jedoch kein Niederschlag auf. Der Ansatz wurde 48 h bei 6°C im Kühlschrank stehengelassen. Anschließend wurde der aufgetretene, feine Niederschlag abzentrifugiert. Nach Dekantieren der Lösung wurde der Niederschlag einmal mit eisgekühltem Wasser gewaschen und dann in DCM aufgenommen.

Nach DC in LM IV und dem LM DCM-Aceton 100:3, jeweils unter Verwendung von HPTLC-Platten, bildete das Acetat eine Zone aus, die nach Rf-Wert und Farbreaktion nach Besprühen mit dem NST/-PEG-Reagens (stark gelbe Fluoreszenz im UV 365 nm) mit E3-Acetat aus *Eclipta alba* übereinstimmte.

3.3. HPLC

Zum Nachweis von Wedelolacton und Desmethylwedelolacton wurden TS I - IV verwendet (s. IV. 2.7.). Die Zuordnung erfolgte durch Überspritzen mit den Vergleichssubstanzen.

Einspritzmengen:

EtOAc-Fractionen: ca. 30 µg (TS I - III)

ca. 84 (W2) bzw. 42 (W3) µg für die in Abb.
39 a (Attn. 20 mAU) und b (Attn. 60 mAU) er-
haltenen Fingerprints (S. 108)

Reinsubstanzen: 1-5 µl einer 0,05%igen Lösung

4. Untersuchungen von LOPHOPHYTUM LEANDRI (Kapitel 5)

4.1. Extraktion

Da die Droge stark quillt (das Volumen wächst in MeOH auf etwa das Doppelte an) konnte sie erst nach 2-stündigem Vorquellen in die Soxhlet-Hülse eingefüllt werden. Wir extrahierten 350 g Droge mit MeOH 72 h lang. Nach vollständigem Einengen am Rotavapor erhielten wir 32,1 g eines rotbraunen Extrakts (entsprechend 9% der eingesetzten Drogenmenge).

4.2. Ausschüttelung

31 g des MeOH-Extraktes wurden in Wasser suspendiert und fünfmal mit je 100 ml EtOAc ausgeschüttelt. Ausbeute: 4,6 g dunkelbraune, körnige EtOAc-Fraktion (etwa 14,8%).

4.3. Dünnschichtchromatographie

Laufmittel:

LM I : Ethylacetat-Methanol-Wasser 100:13,5:10 (227)

LM II : Toluol-Aceton-Ameisensäure 11:6:1

LM III: Toluol-Ethylacetat-Ameisensäure 5:4:1

LM IV : DCM-Methanol-Wasser 14:9:4 (Unterphase)

LM V : Toluol-Aceton-Methanol 11:6:3

LM VI : Chloroform-Eisessig-Wasser 10:9:1

(LM zur Prüfung auf Catechin und Epicatechin)

LM VII: DCM-Wasser-Eisessig 100:50:50 (Unterphase)

Tabelle 27: Rf-Werte der in *Lophophytum leandri* nachgewiesenen Verbindungen

	Narin- genin	Erio- dictyol	Taxi- folin	Proto- catechu- säure	Narin- genin- 7-glc	Erio- dictyol- 7-glc
LM I :	0,9	0,86	0,82	0,7	0,5	0,45
LM II :	0,6	0,56	0,43	0,5	0,13	<0,1
LM III:	0,7	0,66	0,48	0,57	0,1	<0,1
LM IV :	0,7	0,65	0,6	0,42	0,42	0,3
LM V :	0,7	0,6	0,52	0,4	0,3	0,2

Detektion:

UV 254 und 365 nm sowie die Sprühreagentien FeCl_3 und NST/PEG wie bei IV. 1.2., S. 142.

DC-Screening nach (125)

Prüfung auf Anthrachinone (LM I, Det.: 10% methanolische KOH)
Alkaloide (LM I, Det.: essigsaures Dragendorff-Rg.)
Bitterstoffe (LM I, Det.: Vanillin/Schwefelsäure)
Cumarine (DCM-Extrakt, LM: Toluol-EtOAc 93:7)
Etherische Öle (s. bei Cumarinen)
Catechin und Epicatechin (LM VI, Det.: Vanillin-Salzsäure-Reagens (1 g Vanillin wird in 50 ml konz. Salzsäure frisch gelöst, nach Besprühen werden die Platten im vis ausgewertet, die Catechine reagieren unter Rotfärbung))

4.4. Isolierung von Substanz P

Säulenchromatographie

Verwendet wurden 300 g Kieselgel (s. III. 2.1.) und LM I. Auf die Säule (ID 35 mm, Füllhöhe: 430 mm) wurden 3 g EtOAc-Fraktion aufgetragen (Verfahrenstechnik s. III. 2.2.). Nach einem

Vorlauf von 245 ml wurde alle 45 min fraktioniert (13 ml pro Fraktion). Substanz P war in den Fraktionen 37-61 angereichert (insgesamt 1040 mg), jedoch war wegen des starken Tailings die Abtrennung von den Flavonoidglykosiden nicht gelungen.

Präparative DC

Die präparative Schichtchromatographie wurde mit 81 mg der angereicherten Fraktion (in Aceton gelöst) auf 6 vorentwickelten Platten (MeOH, 80% MeOH und 2 mal Aceton) durchgeführt. Nach Entwicklung in LM II wurde die im UV 254 nm markierte Zone ausgekratzt. Es wurde wie bei IV. 2.4.2. beschrieben weiter verfahren. Ausbeute: 12 mg beigefarbenes Pulver.

Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt von aus MeOH kristallisierten weißen Nadeln, die sich nach einiger Zeit wieder bräunlich verfärbten: 201-202°C.

UV (Diodenarray und MeOH): $\lambda_{\max.} = 207, 218, 259, 293 \text{ nm}$

4.5. HPLC

1. Trennsystem: Trennung der EtOAc-Fraktion und Peakzuordnung

apparative Daten: Gerät (1)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 100CH-18/2 (5 μm),
125 x 4 mm ID, Fa. Merck

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphorsäure
60:40:1

B: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphorsäure
10:90:1

Gradient: von 0% A nach 60% A in 25 min, linear
(= 10 - 40% Acetonitril)

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: EtOAc-Fraktion: 8-10 μl einer 0,1%igen Lösung
Reinsubstanzen: 3-5 μl einer 0,05%igen Lösung

2. Trennsystem: Fingerprintanalyse der EtOAc-Fraktion

Aufnahme der UV-Spektren

Quantitative Bestimmungen

apparative Daten: Gerät (2)

Säule: wie bei 1. TS (LiChrospher RP18)

Fließmittel: A: Wasser mit 10 ml 0,1N Phosphorsäure/1

B: Acetonitril mit 10 ml 0,1N Phosphorsäure/1

Gradient: von 10% B nach 40% B in 25 min, linear

Detektion: Fingerprint: 210, 254, 290, 325 nm

(Abb. 43: 290 nm, Attn. 50.0 mAU)

quantitative Bestimmung: 290 nm

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: Fingerprint: 8 µl einer 0,06%igen Lösung

Quantitative Bestimmung:

- Eichgerade (Abb. 47): 0,5; 1; 1,2; 1,5 und
2 µl einer 0,02%igen Lösung (1,00 mg ad
5,0 ml mit MeOH p.a. im Meßkolben)

- EtOAc-Fraktion: 5, 8 und 10 µl einer
0,06%igen Lösung

- MeOH-Extrakt: 5, 8 und 10 µl einer 0,1%-
igen Lösung

Verbindung	Rt(min)	
	1. TS	2. TS
Protocatechusäure	3,6	3,4
Eriodictyol-7-glucosid	12,8	10,3
Taxifolin	13,4	11,2
Naringenin-7-glucosid	15,4	12,7
Eriodictyol	20,0	17,5
Naringenin	24,0	21,3

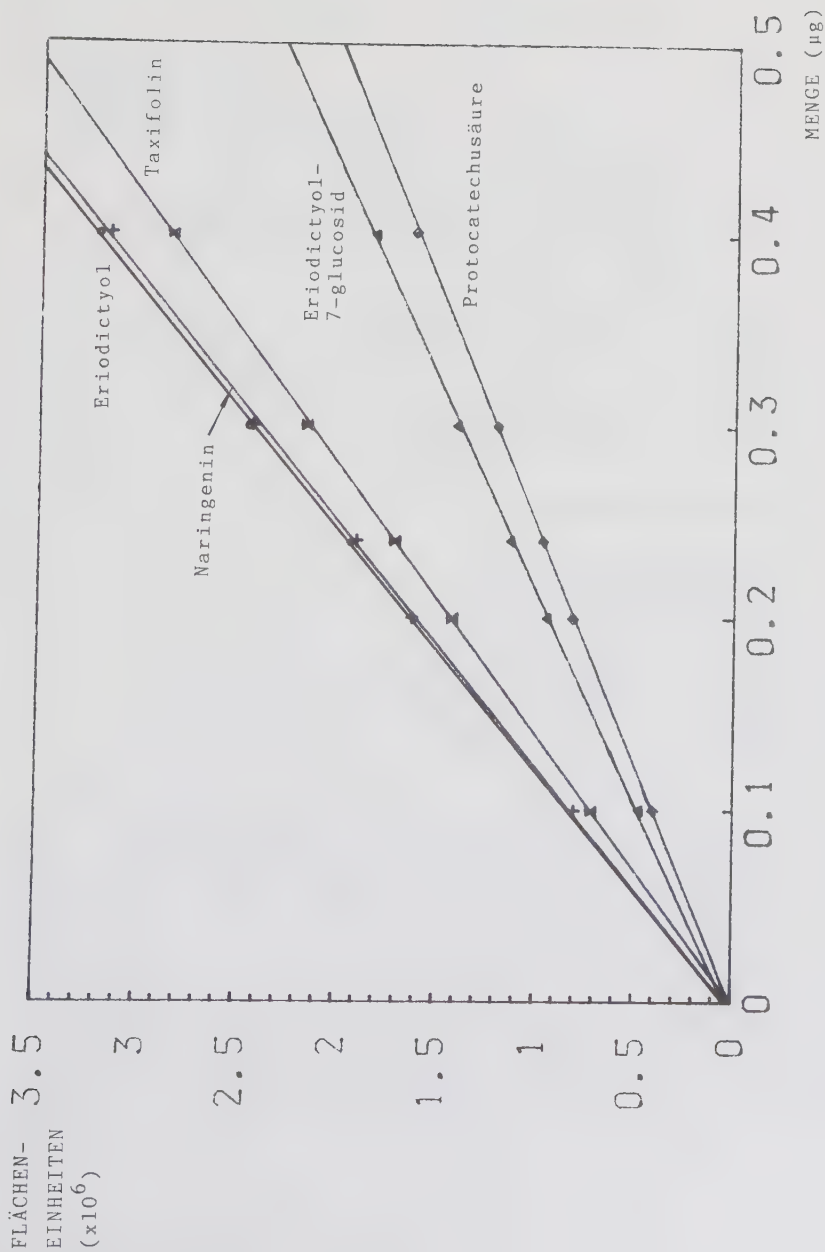


Abb. 47: Eichgeraden für die quantitative Bestimmung der Protocatechusäure und der Flavonoide aus *Lophophytum leandri*

Gehaltsbestimmung

Analog den unter IV. 1.7. und 2.8. beschriebenen Gehaltsbestimmungen wurde für jede Eichsubstanz die Eichgerade durch lineare Regression berechnet ($x(\text{Menge}) = -B + A \cdot y(\text{Fläche})$), die Faktoren A (Steigung) und B sind in Tab. 23, S. 120, angegeben). Entsprechend wurden die jeweiligen Mengen x und die Prozentgehalte (in % des Trockengewichts der EtOAc-Fraktion bzw. des MeOH-Extraktes) bestimmt.

Der Gehalt an Naringenin-7-glucosid wurde berechnet nach Multiplikation der integrierten Fläche mit 0,96444 (MG Naringenin-7-glc : MG Eriodictyol-7-glc) und Verwendung der Eichgeraden von Eriodictyol-7-glucosid.

Die Eichgeraden sind in Abb. 47 dargestellt. Bei allen Verbindungen bestand ein lineares Verhältnis zwischen Peakfläche und Menge (im Bereich 0,1-0,5 µg).

Die in Tab. 23 angegebenen Gehalte sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen.

Relative Standardabweichungen der Gehaltsbestimmungen der EtOAc-Fraktion (%):

Protocatechusäure	2,97
Eriodictyol-7-glucosid	0,43
Taxifolin	1,04
Naringenin-7-glucosid	0,79
Eriodictyol	5,29
Naringenin	2,15

5. Untersuchungen von EICHHORNIA CRASSIPES (Kapitel 6)

5.1. Untersuchungen des Frischpflanzenansatzes

5.1.1. Extraktion

Die Droge wurde über einem Sieb leicht vom EtOH abgepreßt.

Etwa 100 g wurden mit MeOH unter Rückfluß 2 h lang extrahiert.

Dieser Extrakt wurde für das Inhaltsstoff-Screening verwendet.

Aus etwa 200 g abgepresster Droge wurde unter Zugabe von 200 g des abgepressten Ethanolts mit Methanol 24 h im Soxhlet extrahiert. Nach Einengen verblieben 3,5 g "alkoholischer" Extrakt, aus dem Kaffeesäureethylester als Diacetat isoliert wurde.

5.1.2. DC-Screening

Prüfung auf Alkaloide (LM nach (227), Det.: essigsäures Dragendorff-Reagens (125))

Saponine (LM: CHCl_3 -MeOH-H₂O 64:50:10, Det.: Komarowsky-Reagens und Blutkörperschensuspension nach (125))

Flavonoide (LM: EtOAc-HCO₂H-AcOH-H₂O 100:11:11:26 und LM I, Det.: NST/PEG)

Bitterstoffe (die Droge schmeckte nicht bitter, LM nach (227), Det.: Vanillin-Schwefelsäure-Reagens nach (125))

5.1.3. Isolierung und Identifizierung von Kaffeesäureethylesterdiacetat

Der in Wasser aufgenommene "alkoholische" Extrakt wurde sukzessive mit Petrolether und Ethylacetat (sechsmal) ausgeschüttelt. Ausbeute: 160 mg EtOAc-Fraktion aus 3,5 g Extrakt.

Zur Abtrennung von Chlorophyllabbauprodukten wurde eine kleine Säule (ID ca. 17 mm) 120 mm hoch mit RP18-Kieselgel gefüllt und mit MeOH gewaschen. Nach Auftragen der Fraktion wurde mit MeOH eluiert. Wir erhielten 100 mg einer Fraktion, aus der die Hauptverbindung durch präparative DC isoliert wurde (5 viermal vorentwickelte Platten, LM I, Rf 0,57, Elutionsmittel: Aceton p.a.) (Ausbeute: 7 mg). Die Reinigung erfolgte durch Acetylierung von 5 mg dieser Substanz wie folgt:

Zusatz von je 0,3 ml Pyridin und Acetanhydrid, nach 68 h bei Raumtemperatur Zugabe von 5 ml eisgekühltem Wasser, nach 2 h viermaliges Ausschütteln mit DCM, Waschen der organischen Phase mit je 5 ml 20% HCl und Wasser (je dreimal), Trocknen der DCM-Phase über Na₂SO₄. Das erhaltene Peracetat wurde durch erneute präparative DC gereinigt (1 Platte, LM: DCM-Aceton 1:1,

Rf 0,82, Elution mit DCM), Ausbeute: 2,6 mg.

Physikalische Daten

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max.}}$ = 218(sh), 275 nm

MS: (4 kV, 70 eV, 50 μ A, ST 200°)
m/z(rel.Int.%): 292 (M^+)(48), 250 (M-Keten)(57),
208 (M-Keten-Keten)(100), 180 (Abspaltung von C_2H_2
aus Ester)(22), 163 (Abspaltung von OH)(54), 136
(Abspaltung von CO_2)(18)
 1H -NMR: (80 MHz, $CDCl_3$, TMS int.)
 δ (ppm) = 1,3 ($\underline{CH}_3$ - CH_2 -), 2,29 (s, 6H, 2 -OAc),
4,25 (q, 2H, J = 7 Hz, CH_3 - CH_2 -),
6,35 (d, 1H, J = 16 Hz), 7,6 (d, 1H, J =
16 Hz) (die letzten beiden Signale stammen
von den trans-ständigen Protonen der $CH=CH$ -
Gruppe), aromatische Protonen vom $\underline{CHCl}_3$ -
Signal überlagert.

5.2. Untersuchungen der getrockneten Blätter

5.2.1. Extraktion und Ausschüttelung

130 g pulverisierte Droge wurden 48 h mit MeOH im Soxhlet extrahiert. Ausbeute: 17 g grünes Pulver (= 13% eingesetzte Drogenmenge). Nach Aufschlännen in Wasser wurde sechsmal mit Petrolether ausgeschüttelt (Ausbeute: 3,2 g, entsprechend 19% MeOH-Extrakt). Die wässrige Phase wurde anschließend sechsmal mit EtOAc ausgeschüttelt. Ausbeute: 750 mg (entsprechend 4,4% eingesetzter MeOH-Extrakt).

5.2.2. DC-Untersuchungen

Laufmittel

LM I : Toluol-Aceton-Ameisensäure 11:6:1

LM II : Toluol-Aceton 8:2

(Nachweis von Stigmasterol, Rf 0,54, Det.: Komarowsky-Reagens (125))

LM III: DCM-Toluol-Ameisensäure 5:4:1 (zweimalige Entwicklung (237))

LM IV : DCM-Wasser-Eisessig 100:50:50 (Unterphase) (237)

LM V : Ether-Toluol 1:1, gesättigt mit 10%iger Essigsäure

Detektion

UV, FeCl_3 , NST/PEG und NH_3 s. IV. 1.3.

- methanolische Kalilauge: 10%ig (Zone 5 Farbvertiefung im UV)

Mit dem FeCl_3 -Reagens traten folgende Färbungen auf:

Vanillinsäure: hellbraun

Ferulasäure: rotbraun

4-Hydroxybenzoesäure: orange

Kaffee- und Protocatechusäure: dunkelgrün

5.2.3. Isolierung der Phenolcarbonsäuren

120 mg EtOAc-Fraktion wurden auf 5 mit MeOH, Aceton und DCM vorentwickelte Platten aufgetragen. Nach Entwicklung in LM III (zweimal bis zu einer Höhe von 15 cm) wurden die Zonen 1 bis 4 im UV 254 markiert, ausgekratzt und mit MeOH eluiert (zweimal 30-minütiges Rühren auf dem Magnetrührer).

Ausbeuten: Zone 1 (R_f 0,53): 10,2 mg (beigefarbenes Pulver)

Zone 2 (R_f 0,49): 7,8 mg (beigefarbenes Pulver)

Zone 3 (R_f 0,36): 13,3 mg (gelbliches Pulver)

Zone 4 (R_f 0,15): 7,0 mg (schmierige Konsistenz)

Die Identifizierung dieser Substanzen erfolgte durch Überspritzen der Peaks in der HPLC (TS I) und Vergleich der on-line aufgenommenen UV-Spektren (TS II).

Nach kurzer Zeit konnten wir nach DC von Zone 4 die in Abb. 45, S. 130, mit 5 bezeichnete Zone nachweisen, die dem Cumarin Esculetin zugeordnet werden konnte (LM III - V) (vgl. (190)).

5.2.4. HPLC

TS I : Identifizierung der Phenolcarbonsäuren (Zone 1-4)

Trennung der EtOAc-Fraktion und Peakzuordnung

apparative Daten: Gerät (1)

Säule: Hibar LiChrospher RP18 100CH-18/2
(5 μ m), 125 x 4 mm ID, Fa. Merck

Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphor-
säure 60:40:1

B: Acetonitril-Wasser-0,1N Phosphor-
säure 5:95:1

Gradient: von 0% A nach 30% A in 25 min, linear
(= 5% - 21,5% Acetonitril)

Detektion: 254 nm (range 0,1)

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: EtOAc-Fraktion: 5-10 μ l einer 0,1%-
igen Lösung

Reinsubstanzen: 1 μ l einer 0,05%-
igen Lösung

Retentionszeiten: s. Allg. Teil, S. 129

TS II: Fingerprint der EtOAc-Fraktion

Aufnahme der UV-Spektren

Quantitative Bestimmung der Hydroxybenzoesäuren

apparative Daten: Gerät (2)

Säule: wie TS I (s.o.)

Fließmittel: A: Wasser mit 10 ml 0,1N Phosphor-
säure/l

B: Acetonitril mit 10 ml 0,1N Phos-
phorsäure/l

Gradient: von 5% B nach 20% B in 25 min, linear

Detektion: Fingerprint: 200, 254, 290 nm
(Abb. 46: 254 nm, Attn.
70 mAU)

Quantitative Bestimmung: 200 nm

Durchfluß: 1 ml/min

Einspritzmenge: Fingerprint:

10 µl einer 0,05%igen Lösung

Eichgerade:

0,5; 1; 1,5 und 2 µl einer Lösung
von 2,00 mg in 10,0 ml (0,02%)

Quantitative Bestimmung:

1; 1,5; 2 und 3 µl einer Lösung von
10,0 mg in 1,0 ml (1%)

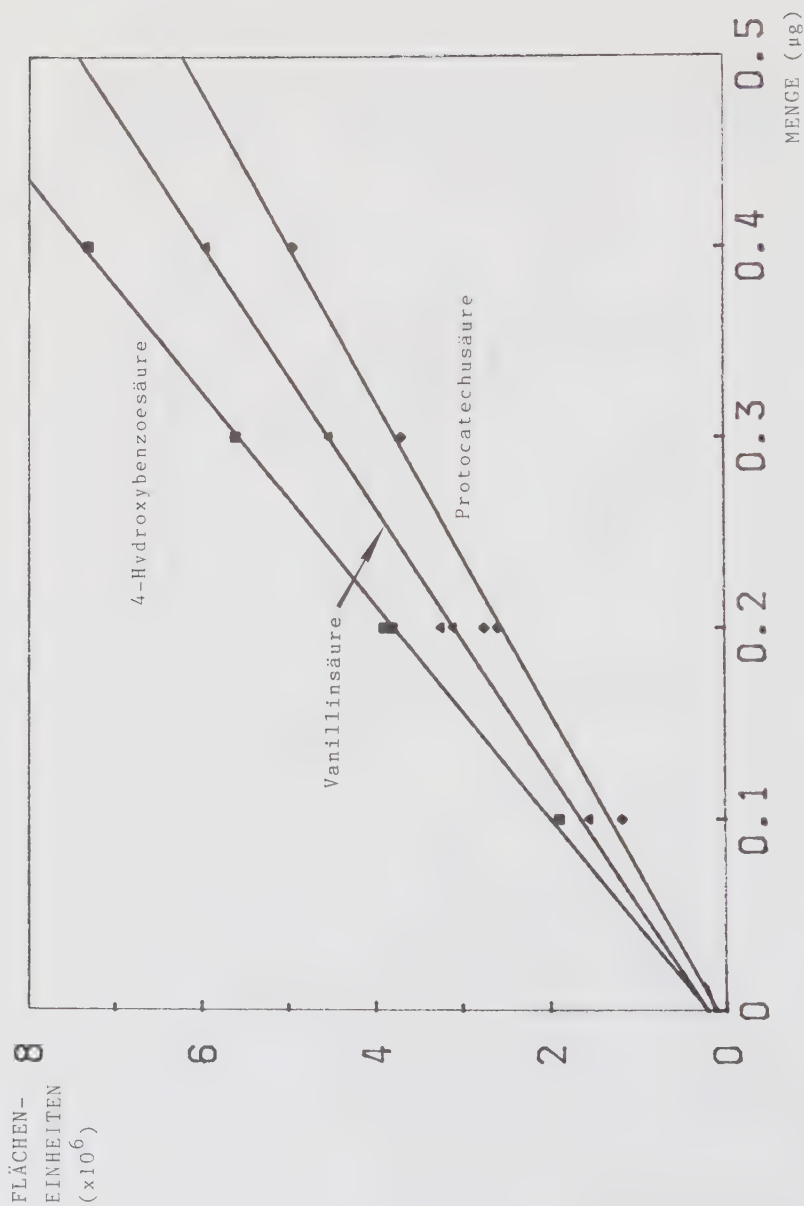


Abb. 48: Eichgeraden zur Bestimmung der Hydroxybenzoesäuren in *Eichhornia crassipes*

Tabelle 28: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Hydroxybenzoesäuren in der EtOAc-Fraktion aus Eichhornia crassipes-Blättern

Substanz	Eichgerade *		eingespr. Menge (μg)	Flächen- einheiten ($\times 10^6$)	Menge (μg)	%-Gehalt in der EtOAc-Fraktion **
Protocatechusäure	A	B				
	0,082	0,008	10	2,2199	0,174	1,74
	(s = 0,012		10	2,1107	0,165	1,65
	r = 0,9956)		15	3,2151	0,256	1,71
			20	4,2600	0,341	1,71
			30	6,6566	0,538	1,79
Vanillinsäure			30	6,4340	0,520	1,73
						$\bar{x} = 1,72\%$
						S = 0,0021
						s = 0,0458
						$\Delta x = 0,0187$
						s _{rel.} = 2,66%
Vanillinsäure	0,069	0,015	10	1,0735	0,059	0,59
	(s = 0,007		10	1,1402	0,064	0,64
	r = 0,9985)		15	1,7310	0,104	0,69
			20	2,2246	0,139	0,69
			30	3,3672	0,217	0,72
			30	3,4945	0,226	0,75
4-Hydroxybenzoesäure	0,056	0,011	10	1,5129	0,074	0,74
	(s = 0,005		10	1,5523	0,076	0,76
	r = 0,9992)		15	2,2816	0,117	0,78
			20	2,9819	0,156	0,78
			30	4,4800	0,240	0,80
			30	4,6084	0,247	0,82
						$\bar{x} = 0,78\%$
						S = 0,0008
						s = 0,0282
						$\Delta x = 0,0115$
						s _{rel.} = 3,63%

* Gleichung für die Eichgerade (lineare Regressionskurve wie bisher): $x(\text{Menge}) = -B + A \cdot y(\text{Fläche})$
mit A = Steigung; statistische Definitionen s. Anhang, s = Standardabweichung, r = Korrelations-
koeffizient

** Statistische Definitionen s. Anhang

V. Pharmakologische Untersuchungen

(vgl. S. 15-21)

1. In vitro-Test mit CCl₄- und GalN-geschädigten Hepatozyten nach HIKINO

Die Versuche wurden von Dr. Y. Kiso, Pharmaceutical Institute, Tohoku Universität, Aoba-yama, Sendai, Japan, durchgeführt (57).

Die genaue Beschreibung der Testmodelle auf antihepatotoxische Aktivität unter Verwendung von durch CCl₄ bzw. GalN geschädigten Hepatozyten-Primärkulturen wird bei (58) und (59) angegeben.

Für das CCl₄-Testmodell werden die Hepatozyten 24 h vorinkubiert (0,2 ml pro Ansatz, 5×10^5 Zellen/ml, 36,5°C, 5% CO₂). Anschließend wird 1 ml Medium mit je 0,01 ml CCl₄ in Ethanol (10 mM, Endkonzentration: 1%) und Probe in DMSO zugegeben.

Nach weiteren 60 min wird der GPT-Spiegel gemessen.

Für das GalN-Modell werden die Hepatozyten 1,5 h vorinkubiert und nach 30 h wird nach Zusatz von 1 ml Medium mit je 0,01 ml 0,5 mM GalN-HCl in Medium und Probe in DMSO der GPT-Spiegel bestimmt.

Die Reproduzierbarkeit ist nach (57) $\pm 10\%$ in verschiedenen Hepatozyten-Kulturen.

Der direkte Einfluß der Testsubstanzen auf die GPT-Aktivität wird nach (22) bestimmt (Konzentration: 1 mg/ml).

HPLC-Untersuchungen der in DMSO gelösten Testsubstanzen (Butrin, Isobutrin, Wedelolacton und Desmethylwedelolacton) zeigten, daß keine Veränderungen der Peaks eintraten.

2. Phalloidin-Schädigungsmodelle

2.1. Hepatozyten-Modell nach RAO

Die Versuche wurden von Prof. G. S. Rao, Institut für klinische Biochemie der Universität Bonn, durchgeführt (91).

Zellschädigung durch Phalloidin

Eine Suspension der nach (90) durch Collagenase-Perfusion frisch isolierten Hepatozyten (Vitalität über 90%, $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden 30 min bei Raumtemperatur Phalloidin (30 µg/ml in Puffer) ausgesetzt. Danach wurden die Ansätze vorsichtig mit 10 µl Trypanblaulösung (0,5% in 0,9% NaCl) gemischt. Nach 2-3 min wurden 0,6 ml der Zellsuspension herauspipettiert und ein aliquoter Teil unter dem Lichtmikroskop (40-fache Vergrößerung) ausgezählt. Dabei wurden jeweils 200-400 Zellen gezählt (s. S. 19). Als Kontrolle dienten Ansätze, die nicht Phalloidin ausgesetzt wurden. Der Prozentsatz an geschädigten Zellen wurde nach der auf S. 19 angegebenen Formel berechnet.

Bestimmung der protektiven Wirkung

Eine Suspension frisch isolierter Hepatozyten ($1-2 \times 10^6$ Zellen) wurde mit den in Propandiol gelösten Testsubstanzen vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dosis: 50 µM für das Screening und 15, 20, 35, 50 und 100 µM für die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 35), die nur dann erstellt wird, wenn beim Screening ein etwa 100%iger Schutz erzielt wird. Als Kontrolle dienten Hepatozytensuspensionen, denen nur Lösungsmittel zugesetzt wurde. Anschließend wurde Phalloidin (30 µg/ml) zugegeben, und die Ansätze wurden nach dem Mischen weitere 30 min stehengelassen. Dann wurden sie auf Eis gestellt und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Der durch die Testsubstanzen ausgeübte Zellschutz wurde nach der auf S. 19 angegebenen Formel bestimmt. Die Experimente wurden 2 oder 3 mal mit Hepatozyten aus verschiedenen Rattenlebern wiederholt.

2.2. Test an der phalloidinvergifteten Maus

Die Tests wurden von Dr. K.P. Odenthal in den Laboratorien der Fa. Madaus & Co., Köln, durchgeführt (92).

Männlichen NMRI-Mäusen wurden die Testsubstanzen (in MeOH-0,9% NaCl 1+4) i.v. appliziert (insgesamt 10 ml/kg, Dosis s. Abb. 16 und 36). 60 min nach der Prüfsubstanzgabe wurde den Tieren Phalloidin i.p. verabreicht (3,5 mg/kg, Stammlösung

1 mg/ml MeOH, daraus verdünnt mit 0,9%iger NaCl-Lösung, Gabe von 20 ml/kg). Die ersten 24 h wurden die Tiere unter Wärmelampen gehalten, danach in Makrolonkäfigen mit Standarddiät und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden 7 Tage lang beobachtet. Die Todesrate wurde in Prozent der Gruppentierzahl angegeben (10 Mäuse pro Gruppe).

3. Stimulierung der RNA-Synthese in Zellkernen aus Rattenleber nach SONNENBICHLER

Die Versuche wurden von Prof. J. Sonnenbichler, Max-Planck-Institut, Martinsried bei München, durchgeführt.

Die Isolierung der Zellkerne aus der Leber von Wistar-Ratten und die zeitabhängige Messung des Einbaus von ^3H -UTP in säurepräzipitierbares Material wurde nach der in (94) beschriebenen Methode durchgeführt. Als Lösungsmittel diente DMSO. Jeder der in den abgebildeten Kurven (Abb. 15 und 37) angegebenen Punkte ist der Mittelwert aus 2 oder 3 Messungen.

A N H A N G

Statistische Definitionen

x_i = Meßwert

n = Anzahl der Meßwerte

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert aller Meßwerte

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} = s^2: \quad \text{Varianz mit (n-1) Gewichtung}$$

$$s = \sqrt{S} \quad : \quad \text{Standardabweichung}$$

$$\Delta \bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad : \quad \text{Standardfehler des Mittelwertes}$$

$$s_{\text{rel.}} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 (\%) \quad : \quad \text{relative Standardabweichung}$$

$$r = \frac{A \cdot s_x}{s_y} \quad : \quad \text{Korrelationskoeffizient}$$

(mit A = Steigung der linearen Regressionskurve,
 $s_{x,y}$ = Standardabweichung der x - bzw. y -Werte)

Die statistischen Definitionen für die Ergebnisse des Hepatozyten-Tests sind in (58) und (59) angegeben.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) KOCH, H.: Pharmazie in unserer Zeit 2, 33-44 und 3, 65-74 (1980)
- 2) ORTMANS, H.: Med. Mo. Pharm. 5, 129-138 (1979)
- 3) "ROTE LISTE" 1985, Verzeichnis von Fertigarzneimitteln der Mitglieder des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie e.V., Editio Cantor, Aulendorf/Württ.
- 4) REMMER, H.: Med. Mo. Pharm. 6, 171 (1983)
- 5) WAGNER, H. in "Natural Products as Medicinal Agents", Hrsg. Beal, J.L. und Reinhard, E., 217-242, Hippocrates Verlag, Stuttgart (1980) und Referenzen daraus
- 6) FIEBIG, M.: Dissertation Universität München (1983)
- 7) VOGEL, G. in "New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity", Hrsg. Wagner, H. und Wolff, P., Springer Verlag, Berlin (1977)
- 8) HAHN, G., LEHMANN, H.D., KÜRTEN, M., UEBEL, H. und VOGEL, G.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 698-704 (1968)
- 9) HAMMERL, H., PICHLER, O. und STUDLAR, M.: Medizinische Klinik 36, 1204-08 (1971)
- 10) GROSS, G. und HAASE, K.: Med. Welt 22, 1350-54 (1971)
- 11) SCHOPEN, R.-D. und LANGE, O.-K.: Med. Welt 21, 691-98 (1970)
- 12) HENNINGS, G.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 29(I), 720 (1979)
- 13) PERRISSOUD, D.: Vortrag beim Kongress "Plant Flavonoids in Biology and Medicine", Buffalo, New York, 22.-26.7.1985
- 14) YUN, H.S. und CHANG, I.M.: Asian J. Pharmacy 4, 3 (1982), zit. nach (17)
- 15) BERGER, F.: "Handbuch der Drogenkunde", Bd. 4, Verlag für Medizinische Wissenschaften Mandrich, Wien (1954)
- 16) NADKARNI, K.M.: "Indian Materia Medica", Bombay Popular Prakashan (1976)
- 17) CHANG, H.M., YEUNG, H.W., TSO, W.-W. und KOO, A. (Hrsg.): "Advances in Chinese Medicinal Materials Research", World Scientific Publ. Co., Singapur (1985) (Internationales Symposium Hong-Kong, 12.-14.6.1984)
- 18) PAVETTI, C., BASUALDO, I., ORTIZ, M. und SORIA, N.: "Plantas Nativas de uso en Medicina Popular en el Paraguay (Parte I)", Universidad Nacional de Asuncion, S. 16
- 19) KIMURA, Y., OKUDA, H., TAIRA, Z., SHOJI, N., TAKEMOTO, T. und ARICHI, S.: Planta Med. 51, 290 (1984)
- 20) KISO, Y., OGASAWARA, S., HIROTA, K., WATANABE, N., OSHIMA, Y., KONNO, C. und HIKINO, H.: Planta Med. 50, 81 (1984)
- 21) HIKINO, H. in "Proceedings of the Alfred Benzon Symposium 20", Hrsg. Krogsgaard-Larsen, P., Brogger, S. und Kofod, H., S. 374-390, Munksgaard, Copenhagen (1984)
- 22) KISO, Y., TOHKIN, M. und HIKINO, H.: J. Nat. Prod. 46(5), 651-54 (1983)
- 23) CHOPRA, R.N., NAYAR, S.L. und CHOPRA, I.C.: "Glossary of Indian Medicinal Plants", New Dehli (1956)
- 24) Produktinformation LIV 52®, The Himalaya Drug Company, Madras 600 006, Indien
- 25) ABE, H., SAKAGUCHI, M., ODASHIMA, S. und ARICHI, S.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 320(3), 266-71 (1982)
- 26) ABE, H., SAKAGUCHI, M., YAMADA, M., ARICHI, S. und ODASHIMA, S.: Planta Med. 40, 366-72 (1980)
- 27) NAZZIMUDDIN, S.K., QUAMARUDDIN, S., TAHERA, S.S., ASHFAQUID-DIN, M., REHANA, A. und ALI, I.: Bull. Islamic Med. 1, 448 (1981)

- 28) KISO, Y., SUZUKI, Y., WATANABE, N., OSHIMA, Y. und HIKINO, H.: *Planta Med.* 49, 185 (1983)
- 29) WAGNER, H.: "Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe", 3. Aufl., G. Fischer Verlag, Stuttgart (1985)
- 30) OUDOT, P.: *Sem. Hôp. (Paris)* 48 (1947)
- 31) BHARGAYA, K.K. und SESHADRI, T.R.: *J. Res. Ind. Med.* 9(1), 9-14 (1974)
- 32) MA-MA, K., NYUNT, N. und TIN, K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 723 (1978)
- 33) THYAGARAJAN, S.P., THIRUNEELAKANTAN, K., SUBRAMANIAN, S. und SUNDARAVELU, T.: *Ind. J. Med. Res.* 76 (Suppl.) 124-30 (1982)
- 34) WIESENAUER, M.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 12, 594 (1984)
- 35) "HOMÖOPATHISCHES REPETITORIUM", Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (1982)
- 36) SCHOELER, H.: *Allg. Homöopath. Ztg.* 218, 2 (1973)
- 37) WIESENAUER, M.: *Erfahrungsheilkunde* 7, 446 (1984)
- 38) KISO, Y., TOHKIN, M., HIKINO, H., HATTORI, M., SAKAMOTO, T. und NAMBA, T.: *Planta Med.* 51 298 (1984)
- 39) SCHWABE, W. und HERZ, W.: *Allg. Homöopath. Ztg.* 209, 228 (1964)
- 40) SCHWABE, W.: *Allg. Homöopath. Ztg.* 225, 217-29 (1980)
- 41) PANDEY, V.N. und CHATURVEDI, G.N.: *Ind. J. Med. Res.* 57, 503 (1969), zit. nach (5)
- 42) KLOSS, P. und SCHWABE W.: *Ger. Offen.* 2, 203, 884 (1972), zit. nach (5)
- 43) ROW, L.R. und SRINIVASULU, C.: *Tetrahedron Lett.* 24, 1557 (1964)
- 44) CHAUHAN, J.S., SULTAN, M. und SRINIVASTAVA, S.K.: *Planta Med.* 32, 217 (1977)
- 45) MEHRA, P.N. und HANDA, S.S.: *Indian J. Pharm.* 30, 284 (1968)
- 46) CHANG, I.M. und YUN, H.S.: *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 42, 684 (1980),
- 47) MARINI-BETTOLO, G.B.: *Fitoterapia* 2, 51 (1981)
- 48) ARYA, V.P.: *Drugs of the Future* 3(8), 613 (1978)
- 49) HIKINO, H., KISO, Y., TAGUCHI, H. und IKEYA, Y.: *Planta Med.* 50, 213 (1984)
- 50) PAHLOW, M.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 34, 1663 (1984)
- 51) HIKINO, H., KISO, Y., AMAGAYA, S. und OGIHARA, Y.: *J. Ethnopharm.* 12, 231-35 (1984)
- 52) HIKINO, H., SUGAI, T., KONNO, C., HASHIMOTO, I., TERASAKI, S. und HIRONO, I.: *Planta Med.* 36, 156-63 (1979)
- 53) HIKINO, H., KISO, Y., KUBOTA, M., HATTORI, M. und NAMBA, T.: *Shoyakugaku Zasshi* 38, 359 (1984)
- 54) GROS, H.: *Pharmaz. Ztg.* 19, 633-36 (1975)
- 55) WAGNER, H.: Vortrag beim Kongress "Plant Flavonoids in Biology and Medicine", Buffalo, New York, 22.-26.7.1985
- 56) HENNINGS, G. in "International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver", Hrsg. Conn, H.O., London (1981)
- 57) HIKINO, H.: persönliche Mitteilungen
- 58) KISO, Y., TOHKIN, M. und HIKINO, H.: *Planta Med.* 49, 222 (1983)
- 59) KISO, Y., TOHKIN, M. und HIKINO, H.: *J. Nat. Prod.* 46, 841-47 (1983)
- 60) BERRY, M.N. und FRIEND, D.S.: *J. Cell Biol.* 43, 506-20 (1969)
- 61) SEGLE, P.O.: *Meth. Cell Biol.* 13, 29-83 (1976) und dort zitierte Originalarbeiten
- 62) BAUR, H., KASPEREK, S. und PFAFF, E.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 827 (1975)
- 63) KATO, S., AOYAMA, K., NAKAMURA, T. und ICHIHARA, A.: *J. Biol. Chem.* 86, 1419-25 (1979)

- 64) VINA, J., HEMS, R. und KREBS, H.A.: Biochem. J. 170, 627 (1978)
- 65) ROSEN, H.: Dissertation Universität München (1980)
- 66) MOLDEUS, P., HÖGBERG, J. und ORRENIUS, S.: Meth. Enzymol. 52, 60-71 (1978)
- 67) PFAFF, E., SCHULER, B., KRELL, H. und HÖKE, H.: Arch. Toxicol. 44, 3-21 (1980)
- 68) WAGLE, S.R. und INGEBRETSEN, W.R.: Meth. Enzymol. 35, 579 (1973)
- 69) SAID, M.M., IBRAHIM, M.H. und MEKKAWY, M.Y.: Pharmazie 39, 64 (1984)
- 70) GRICE, H.C., BARTH, M., CORNISH, H., FOSTER, G. und GRAY, R.H.: Food Cosmet. Toxicol. 9, 847 (1971), zit. nach (59)
- 71) BERGMAYER, H.U. (Hrsg.): "Methoden der Enzymatischen Analyse", 3. Aufl., Bd. 1, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1974)
- 72) RECKNAGEL, R.O. und GLENDE, E.A.: CRC Crit. Rev. Toxicol. 2, 263-297 (1973)
- 73) DIANZANI, M. in "Pathogenesis and Mechanisms of Liver Cell Nekrosis", Hrsg. Keppler, D., 225-238, MTP, Lancaster (1975)
- 74) FODOR, O., SCHVARTZ, M., SUCIU, A., BARBARINO, F., DUCA, S. und LEZEU, R.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 26, 855 (1976)
- 75) PICKERING, P.W., JAMES, G. und PARKER, F.L.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 898 (1975)
- 76) SCHANNE, F.A., PFAU, R.G. und FARBER, J.: Am. J. Pathol. 100, 25 (1980), zit. nach (59)
- 77) BACHMANN, W., HARMS, E., HASSELS, B., HENNINGER, H. und REUTTER, W.: Biochem. J. 166, 455-62 (1977)
- 78) KEPPLER, D., RUDIGIER, J., REUTTER, W., LESCH, R. und DECKER, K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 102 (1970)
- 79) LAI, E.K., McCAY, P.B., NOGUCHI, T. und FONG, K.-L.: Biochem. Pharmacol. 28, 2231 (1979)
- 80) MASUDA, Y. und MURANO, T.: Biochem. Pharmacol. 26, 2275-82 (1977)
- 81) KARLSSON, P.: "Kurzes Lehrbuch der Biochemie", Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1977)
- 82) BAUER, C.H., LUKASCHEK, R. und REUTTER, W.: Biochem. J. 142, 221-30 (1974)
- 83) OSHIMA, Y., KAWAKAMI, Y., KISO, Y., HIKINO, H., YANG, L.-L. und YEN, K.-Y.: Shoyakugaku Zasshi 38(2), 201 (1984)
- 84) ABE, H., ORITA, M., KONISHI, H., ARTCHI, S. und ODASHIMA, S.: J. Pharm. Pharmacol. 37, 555-59 (1985)
- 85) LOTTER, H.: Z. Naturforsch. 39c, 535-42 (1984)
- 86) FRIMMER, M. und KROKER, R.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 394 (1975)
- 87) FAULSTICH, H., WIELAND, T., WALLI, A. und BIRKMANN, K.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1162 (1974)
- 88) PETZINGER, E., HOMANN, J. und FRIMMER, M.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25(4), 571 (1975)
- 89) WIELAND, T. und FAULSTICH, H.: CRC Crit. Rev. Biochem., Hrsg. Fasman, G.D., 185-261, CRC Press (1978)
- 90) ECKEL, J., RAO, G.S., RAO, M.L. und BREUER, H.: Biochem. J. 182, 473-91 (1979)
- 91) RAO, G.S.: persönliche Mitteilungen
- 92) ODENTHAL, K.P. (Fa. Madaus & Co., Köln): persönliche Mitteilungen
- 93) SONNENBICHLER, J., MATTERSBERGER, J. und ROSEN, H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1171-80 (1976)
- 94) MACHICAO, F. und SONNENBICHLER, J.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 141-47 (1977)

- 95) SONNENBICHLER, J., MATTERSBERGER, J. und HANSER, G.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1751 (1980)
- 96) SONNENBICHLER, J. und POHL, A.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1757 (1980)
- 97) SONNENBICHLER, J. und ZETL, I.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 555 (1984)
- 98) BALAZS, T., MURRAY, T.K., McLAUGHLAN, J.M. und GRICE, H.C.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 3, 71 (1961)
- 99) SUAREZ, K.A., CARLSON, G.P., FULLER, G.C. und FAUSTO, N.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 171-77 (1972)
- 100) PLAA, G.L. und WITSCHI, H.: Ann. Rev. Toxicol. Pharmacol. 16, 125-41 (1976)
- 101) SLATER, T.F.: Biochem. Soc. Trans. 1, 922 (1973)
- 102) KEPLER, D., LESCH, R., REUTTER, W. und DECKER, K.: Exp. Mol. Pathol. 9, 279-90 (1968)
- 103) GRAZIANI, Y. und CHAYOTH, R.: Biochem. Pharmacol. 26, 1259 (1977)
- 104) Dtsch. Apoth. Ztg. 37, VII (1985) unter der Rubrik "Die Arzneimittelkommission der Deutschen Apotheker informiert"
- 105) HARBORNE, J.B., BOULTER, D. und TURNER, B.L.: "Chemotaxonomy of the Leguminosae", Academic Press, London (1971)
- 106) ENGLER, A.: "Syllabus der Pflanzenfamilien", 12. Aufl., Gebrüder Bornträger Verlag, Berlin (1964)
- 107) OKE, M.S., THOMAS, P. und SHRIKHANDE, A.J.: J. Food Sci. 45, 746 (1980)
- 108) ROXBURGH, W.: "Flora Indica", Thacker & Co., London (1874)
- 109) HARBORNE, J.B., MABRY, T.J. und MABRY, H.: "The Flavonoids", Chapman and Hall, London (1975)
- 110) PURI, B. und SESHADRI, T.R.: J. Sci. Ind. Res. 12B, 462-66 (1953)
- 111) PURI, B. und SESHADRI, T.R.: J. Chem. Soc. 1589 (1955)
- 112) Patent-Brit. 437,051, Schering-Kahlbaum AG, Berlin (1935)
- 113) GUPTA, S.R., RAVINDRANATH, B. und SESHADRI, T.R.: Phytochem. 9, 2231-35 (1970)
- 114) JAIN, S.C., KAMAL, R. und RATHORE, A.K.: Indian Drugs 17, 145 (1980)
- 115) FARKAS, L. und PALLOS, L.: Chem. Ber. 93, 1272 (1960)
- 116) SESHADRI, T.R. und TRIKHA, R.K.: Indian J. Chem. 9, 1201 (1971)
- 117) BISHNOI, P. und GUPTA, P.C.: Planta Med. 35, 286 (1979)
- 118) MEHTA, B. und BOKADIA, M.M.: Chem. Ind. 7, 98 (1980)
- 119) BOCHIS, R.J. und FISHER, M.H.: Tetrahedron Lett. 16, 1971-74 (1968)
- 120) HOREYSI, V., TICHA, M., NOVOTNY, J. und KOCOUREK, J.: Biochim. Biophys. Acta 623, 439 (1980)
- 121) DHAR, M.L., DHAR, M.M., DHAWAN, B.N., MEHROTRA, B.N., SRIMAL, R.C. und TANDON, J.S.: Indian J. Exp. Biol. 11, 43 (1973)
- 122) NAZIMUDDIN, S.K. und KHALEEFATHULLAH, S.: Bull. Islamic Med. 2, 522-27 (1982)
- 123) FRIMMER, M., PETZINGER, E. und HOMANN, J.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 1881 (1975)
- 124) WULF, L.W. und NAGEL, C.W.: J. Chromatogr. 116, 271 (1976)
- 125) WAGNER, H., BLADT, S. und ZGAINSKI, E.-M.: "Drogenanalyse", Springer Verlag, Berlin (1983)
- 126) GEISSMANN, T.A.: "The Chemistry of Flavonoid Compounds", Pergamon Press, London (1962)
- 127) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. und THOMAS, M.B.: "The Systematic Identification of Flavonoids", Springer Verlag (1970)

- 128) MARKHAM, K.R.: "Techniques of Flavonoid Identification", Academic Press, London (1982)
- 129) PRETSCH, E., CLERC, T., SELBL, J. und SIMON, W.: "Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden", Springer Verlag (1976)
- 130) BARBER, M., BORDOLI, R.S., SEDGWICK, R.D. und TYLER, A.N.: Nature 293, 270 (1981)
- 131) RINEHARDT, K.L.: Science 218, 254 (1982)
- 132) NIBBERING, N.M.: J. Chromatogr. 251, 93 (1982)
- 133) WILLIAMS, D.H., BRADLEY, C., BOJESSEN, G., SANTIKARN, S. und TAYLOR, L.C.E.: J. Am. Chem. Soc. 103, 5700 (1981)
- 134) BARBER, M., BORDOLI, R.S., ELLIOT, G.J., SEDGWICK, R.D. und TYLER, N.: Anal. Chem. 54, 645A (1982)
- 135) HÄNSEL, R.: Arzneiztschr. f. Naturheilverf. 23, 705 (1982)
- 136) KOORDERS, S.H. und VALETON, T.: "Atlas der Baumarten von Java", Verlag der Buch- und Steindruckerei, Leiden (1913)
- 137) KARTNIG, T. und WEGSCHAIDER, O.: J. Chromatogr. 61, 375 (1971)
- 138) SELIGMANN, O.: persönliche Mitteilungen
- 139) MADUBUNYI, I.: Dissertation University of Nigeria Nsukka (1983)
- 140) SONNENBICHLER, J.: persönliche Mitteilungen
- 141) PETKOV, E., NIKOLOV, N. und UZUNOV, P.: Planta Med. 43, 183-86 (1981)
- 142) HIKINO, H., KISO, Y., WAGNER, H. und FIEBIG, M.: Planta Med. 50, 248 (1984)
- 143) BAUER, R.: Dissertation Universität München (1984)
- 144) STUESSY, T.C. in "The Biology and Chemistry of the Compositae", Hrsg. Heywood, V.H., Harborne, J.B. und Turner, B.L., Academic Press, London (1977)
- 145) OHWI, J.: "Flora of Japan", Smithsonian Institution, Washington D.C. (1965)
- 146) "The Wealth of India, Raw Materials", Bd. III, Council of Scientific and Industrial Research, New Dehli (1952)
- 147) DRAGGENDORFF, G.: "Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten", W. Fritsch Verlag, München (1967)
- 148) HAERDI, F.: "Afrikanische Heilpflanzen", Verlag für Recht und Gesellschaft, Basel (1964)
- 149) VAIDYA BHAGWAN DASH: "Ayurvedic Treatment for Common Diseases", Dehli Diary (1974), zit. nach (24)
- 150) KRISHNASWAMY, N.R. und SHARMA, B.R.: Indian Sci. Congr. Ass. Proc. 54(3), 141 (1967)
- 151) JOGLEKAR, G.V., CHITALE, G.K. und BALWANI, J.H.: Acta Pharmacol. Toxicol. 20, 73-79 (1963)
- 152) KARANDIKAR, S.M., JOGLEKAR, G.V., CHITALE, G.K. und BALWANI, J.H.: Acta Pharmacol. Toxicol. 20, 274 (1963)
- 153) DHAR, M.L., DHAR, M.M., DHAWAN, B.N., MEHROTA, B.N. und RAY, C.: Indian J. Exp. Biol. 6, 232 (1968)
- 154) SARG, T.M., SALAM, N.A., EL-DOMIATY, M. und KHAFAGY, S.M.: Sci. Pharm. 49, 262-64 (1981)
- 155) DIXIT, S.P. und ACHAR, M.P.: J. Sci. Res. Plants Med. 2, 96 (1981)
- 156) PRAKASH, A., PASALU, I.C. und MATHUR, K.C.: Curr. Sci. 48, 1090 (1979)
- 157) PAL, S.N. und NARASIMHAM, M.: J. Indian Chem. Soc. 20, 181 (1943)

- 158) HALIM, A.F., BALBAA, S.I. und KHALIL, A.T.: Vortrag beim Symposium der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Graz, Österreich, 12.-17.7.1982
- 159) SIKRORIA, B.C., SRIVASTAVA, S.J. und NIRANJAN, G.S.: J. Indian Chem. Soc. 59(7), 905 (1982)
- 160) BHARGAVA, K.K., KRISHNASWAMY, N.R. und SESHADRI, T.R.: Indian J. Chem. 8, 664 (1970)
- 161) BHARGAVA, K.K., KRISHNASWAMY, N.R. und SESHADRI, T.R.: Indian J. Chem. 10, 810 (1972)
- 162) KRISHNASWAMY, N.R. und PRASANNA, S.: Indian J. Chem. 8, 761 (1970)
- 163) KRISHNASWAMY, N.R., SESHADRI, T.R. und SHARMA, B.R.: Tetrahedron Lett. 35, 4227-30 (1966)
- 164) BOHLMANN, F. und ZDERO, C.: Chem. Ber. 103, 834 (1970)
- 165) SINGH, P., SHARMA, A.K., JOSHI, K.C. und BOHLMANN, F.: Phytochem. 24(3), 615 (1985)
- 166) BICKOFF, E.M., SPENCER, R.R., WITT, S.C. und KNUCKLES, B.E.: Tech. Bull. 1408, US Department of Agriculture (1969)
- 167) WONG, E. in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", Hrsg. Zechmeister, L., Bd. 28, 1-63, Springer-Verlag, Wien (1970)
- 168) RAO, P.P. und SRIMANNARAYANA, G.: Phytochem. 19, 1272 (1980)
- 169) SACHDEV, K.S., ROY, P.B., VASAVADA, S.A., DAVE, K.C. und JOSEPH, A.D.: Ind. J. Pharm. 27(9), 253-56 (1965)
- 170) TITTEL, G.: Dissertation Universität München (1978)
- 171) ENGLER, A. und PRANTL, K.: "Die natürlichen Pflanzenfamilien", Verlag W. Engelmann, Leipzig (1891)
- 172) JURD, L.: J. Org. Chem. 24, 1786 (1959)
- 173) JURD, L.: Arch. Biochem. Biophys. 63, 376 (1956)
- 174) ZILG, H. und GRISEBACH, H.: Phytochem. 7, 1765 (1968)
- 175) SAITOH, T. und SHIBATA, S.: Chem. Pharm. Bull. 17, 729 (1969)
- 176) HARPER, S.H., KEMP, A.D., UNDERWOOD, W.G.E. und CAMPBELL, R.V.M.: J. Chem. Soc. (C), 1109 (1969)
- 177) BARNES, C.S. und OCCOLOWITZ, J.L.: Austral. J. Chem. 17, 975 (1964)
- 178) BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. und WILLIAMS, D.H.: "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Bd. II, Holden-Day, San Francisco (1964)
- 179) SHAPIRO, R.H. und DJERASSI, C.: J. Org. Chem. 30, 955 (1965)
- 180) DREWES, S.E.: "Progress in Mass Spectrometry, Chroman and Related Compounds", Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim (1974)
- 181) DONNELLY, D.M.X. und FITZGERALD, M.A.: Phytochem. 10, 3147 (1971)
- 182) KIUCHI, F., SHIBUYA, M., KINOSHITA, T. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 31, 3391 (1983)
- 183) BICKOFF, E.M., LIVINGSTON, A.L. und BOOTH, A.N.: Arch. Biochem. Biophys. 88, 262 (1960)
- 184) KRISHNASWAMY, N.R., SESHADRI, T.R. und SHARMA, B.R.: Indian J. Chem. 4, 120 (1966)
- 185) LIVINGSTON, A.L., WITT, S.C., LUNDIN, R.E. und BICKOFF, E.M.: J. Org. Chem. 30, 2353 (1965)
- 186) KIUCHI, F., SHIBUYA, M. und SANKAWA, U.: Chem. Pharm. Bull. 30, 2279 (1982)
- 187) BAUMANN, J., von BRUCHHAUSEN, F. und WURM, G.: Prostaglandins 20, 627 (1980)
- 188) KUHLE, P., SHILOH, R., IHA, H., MURAWSKI, U. und ZILLIKEN, F.: Prostaglandins 28, 783 (1984)
- 189) DEWHIRST, F.E.: Prostaglandins 20, 209 (1980)

- 190) HERRMANN, K. in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", Hrsg. Zechmeister, L., Bd. 35, 73-132, Springer-Verlag (1978)
- 191) BRANDL, W. und HERRMANN, K.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 178, 192 (1984)
- 192) MÖLLER, B. und HERRMANN, K.: J. Chromatogr. 241, 371 (1982)
- 193) INGHAM, J.L. in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", Hrsg. Zechmeister, L., Bd. 43, 1-266, Springer-Verlag, Wien (1983)
- 194) FIEBRICH, F. und KOCH, H.: Experientia 35, 1548 (1979)
- 195) HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH, 4. Nachtrag 1985, 1. Ausgabe 1978, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- 196) AMMON, H.P.T.: Dtsch. Apoth. Ztg. 41, 2117 (1982)
- 197) HIKINO, H., KISO, Y., HATANO, T., YOSHIDA, T. und OKUDA, T.: J. Ethnopharm. 14, 19-29 (1985)
- 198) HIKINO, H., KISO, Y., KATO, N., HAMADA, Y., SHIORI, T., AIYAMA, R., ITOKAWA, H., KIUCHI, F. und SANKAWA, U.: J. Ethnopharm. 14, 31-39 (1985)
- 199) YOUNES, M. und SIEGERS, C.-P.: Planta Med. 43, 240-44 (1981)
- 200) KAPPUS, H., KIECZKA, H., SCHEULEN, M. und REMMER, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, 179-87 (1977)
- 201) ANTUS, S.: persönliche Mitteilung
- 202) FIEBIG, M. und WAGNER, H.: Planta Med. 50, 310 (1984)
- 203) BHAKUNI, D.S., DHAR, M.L., DHAR, M.M., DHAWAN, B.N., GUPTA, B. und SRIMAL, R.C.: Indian J. Exp. Biol. 9, 91-102 (1971)
- 204) GOVINDACHARI, T.R., NAGARAJAN, K. und PAI, B.R.: J. Chem. Soc. 15B, 629 (1956)
- 205) GOVINDACHARI, T.R., NAGARAJAN, K., PAI, B.R. und PARTHASARATHY, P.C.: J. Chem. Soc. 545-47 (1957)
- 206) GOVINDACHARI, T.R., NAGARAJAN, K. und PARTHASARATHY, P.C.: J. Chem Soc. 548-51 (1957)
- 207) WANZLICK, H.-W., GRITZKY, R. und HEIDEPRIEM, H.: Chem. Ber. 96, 305 (1963)
- 208) SLATER, T.F. und SAWYER, B.C.: Biochem. J. 123, 823-28 (1971)
- 209) BAUMANN, J. und von BRUCHHAUSEN, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 306, 85 (1979)
- 210) WIERER, M.: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
- 211) FESSLER, B.: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
- 212) WELTON, A.F., TOBIAS, L.D., FIEDLER-NAGY, C., ANDERSON, W., HOPE, W., MEYERS, K. und COFFEY, J.: Vortrag beim Kongress "Plant Flavonoids in Biology and Medicine", Buffalo, New York, 22.-26.7.1985
- 213) GOVINDACHARI, T.R. und PREMILA, M.S.: Phytochem. 24(12), 3068-69 (1985)
- 214) RAESIDE, J.R.: Brit. Homoeopath. J. 28, 240 (1969)
- 215) WEINGES, K., KOLB, R. und KLOSS, P.: Phytochem. 10, 829 (1971)
- 216) WIESENAUER, M.: Ärztezeitschr. f. Naturheilverf. 7, 475 (1985)
- 217) FREIWALD, E.: Allg. Homöopath. Ztg. 209, 232 (1964)
- 218) WOLTER, H.: Allg. Homöopath. Ztg. 213, 433 (1968)
- 219) WOLTER, H.: Allg. Homöopath. Ztg. 227, 244 (1982)
- 220) GREIFF, W.: Allg. Homöopath. Ztg. 220(5), 186 (1975)
- 221) WOLTER, H.: Allg. Homöopath. Ztg. 224, 90-99 (1979)
- 222) HARISCH, G., MÜLLER, R. und MEYER, W.: Allg. Homöopath. Ztg. 229(5), 190 (1984)
- 223) KLOSS, P.: Naturwiss. 54, 472 (1967)

- 224) HEGNAUER, R.: "Chemotaxonomie der Pflanzen", Bd. 3, 224, Birkhäuser Verlag, Stuttgart (1964)
- 225) MARTIUS, C.F.P.: "Flora Brasiliensis", Bd. IV, 2, München (1878)
- 226) HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH, 3. Nachtrag 1985, 1. Ausgabe 1978, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
- 227) HÖRHAMMER, L., WAGNER, H. und BITTNER, G.: Pharmaz. Ztg. 108, 259 (1963)
- 228) ENGLER, A. und PRANTL, K.: "Die natürlichen Pflanzenfamilien", Teil II, 4, 74 (1889)
- 229) JAYARAMAN, K.S.: Nature 291, 183 (1981)
- 230) SHARMA, A.: Curr. Sci. 40, 51-55 (1971)
- 231) GIBBS, R.D.: "Chemotaxonomy of Flowering Plants", Bd. III, McGill-Queen's University Press, Montreal/London (1974)
- 232) CHUGHTAI, M., KHOKHAR, I. und ASLAM, M.: Pak. J. Sci. Res. 32, 115 (1980)
- 233) GOSWAMI, P.C., NAG, B., SHARMA, A.K., BORTHAKUR, A., SINGH, H.D. und BARUAH, J.N.: Curr. Sci. 52, 806 (1983)
- 234) HAQ, Q.N. und MOLLAH, N.I.: Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 9, 6-10 (1974)
- 235) ANJANEYALU, Y., GOWDA, D.C. und NEELISIDDIAH, B.: Phytochem. 22, 1961-63 (1983)
- 236) SHIBATA, M., YAMAZAKI, K. und ISHIKURA, N.: Botan. Mag. (Tokyo) 78, 299 (1965), zit. nach C.A. 65, 1035 (1966)
- 237) SCHULZ, J.M. und HERRMANN, K.: J. Chromatogr. 195, 85-94 (1980)
- 238) HP 3392A Integrator Owner's Manual, Hewlett-Packard, November 1983
- 239) KREUTZKAMP, B.: Dissertation Universität München (1984)
- 240) LAURIE, W.A., McHALE, D. und SHERIDAN, J.B.: Phytochem. 24, 2659 (1985)
- 241) WAGNER, H., WIERER, M. und BAUER, R.: Planta Med. in Druck
- 242) WAGNER, H. und FESSLER, B.: Planta Med. in Druck
- 243) LEON, H.: "Flora de Cuba", Bd. 1, 303, Cultural, S.A., La Habana (1946)
- 244) MAROS, T., RACZ, G., KATONAI, B. und KOVACS, V.: Arzneimittel.-Forsch. (Drug Res.) 16, 127 (1966)
- 245) MAROS, T., SERES-STURM, L., RACZ, G., RETTEGI, C., KOVACS, V. und HINTS, M.: Arzneimittel.-Forsch. (Drug Res.) 18, 884 (1966)
- 246) Behringwerke AG: "Klinisch-chemische Bestimmungen, Leberdiagnostik" (1982)
- 247) "Medical Plants of India", Bd. 1, 154-58 und 368-70, Indian Council of Medical Research, New Dehli (1976)
- 248) HÜBNER, K.: Therapiewoche 36, 3846-59 (1974)
- 249) LIE, T.S.: Münch. Med. Wschr. 126(21), 693 (1984)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hildebert Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich besonders herzlich danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Wagner, für sein großes Interesse an dieser Arbeit, deren großzügige Förderung und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. H. Hikino und Dr. Y. Kiso, Tohoku University, Aobayama, Sendai, Japan, für die schnelle und freundliche Durchführung von zahlreichen pharmakologischen Tests mit Hepatozyten.

Herrn Prof. J. Sonnenbichler, MPI Martinsried bei München, für die freundliche Durchführung der pharmakologischen Tests mit Zellkernen aus Rattenleber.

Herrn Prof. G.S. Rao, Institut für klinische Biochemie der Universität Bonn, und Herrn Dr. K.P. Odenthal, Fa. Madaus & Co., Köln, für die Durchführung weiterer pharmakologischer Tests (Phalloidin-Modelle).

Herrn Dr. O. Seligmann für die schnelle Durchführung sämtlicher physikalisch-chemischen Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München und seine hilfreichen Diskussionsbeiträge.

Herrn Prof. A.F. Halim, Mansoura University, Ägypten, für die freundliche Überlassung von Wedelolacton.

Herrn Dr. M. Fiebig, Fa. Thomae, Ulm, für die Überlassung von zahlreichen Extrakten sowie die zu Beginn dieser Arbeit gewährte Hilfestellung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Darüberhinaus möchte ich auch ganz herzlich allen nicht genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts danken, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders Herrn Harald Reger für seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der HPLC-Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Freundin Ursula Strasser für die sorgfältige Anfertigung zahlreicher Abbildungen sowie meinem Freund Wolfgang für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und sein stetes Verständnis.

L E B E N S L A U F

Bettina Christel G e y e r

geboren am 7.5.1958 in Wiesbaden

Eltern: Hans Geyer, Glasing. i.R.
Erika Geyer, geb. Geyer, kaufmännische
Angestellte i.R.

Schulbildung: 1964 - 1968 Volksschule in Hauppauge,
Long Island, New York
1968/69 Volksschule Baldham
1969 - 1971 Gymnasium München, Fehwiesen-
straße
1971/72 Michaeli-Gymnasium, München
1972 - 1978 Gymnasium Vaterstetten
Abitur: Juni 1978 Gymnasium Vaterstetten

Studium der Pharmazie: WS 1978/79 - WS 1981/82
Ludwig-Maximilians-Universität, München

2. Abschnitt der
Pharm. Prüfung: 29. April 1982

Pharmazie-Praktikum: Juni 1982 - Mai 1983
Apotheke am Bahnhof, Vaterstetten

3. Abschnitt der
Pharm. Prüfung: 14. Juli 1983
Approbation: 25. Juli 1983

Wissenschaftliche
Tätigkeit: 1.9.1983 Beginn der vorliegenden Arbeit
unter der Leitung von Prof.Dr. H. Wagner
am Institut für Pharmazeutische Biologie
der Universität München,
gleichzeitige Tätigkeit als wissenschaft-
liche Hilfskraft

